

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 781**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/34** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**C07K 14/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 14180718 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2851428**

54 Título: **Vacunas y diagnóstico de torque teno virus porcino**

30 Prioridad:

**21.08.2009 US 235833 P**

**23.03.2010 US 316519 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.06.2020**

73 Titular/es:

**VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES,  
INC. (100.0%)**

**2200 Kraft Drive, Suite 1050  
Blacksburg, VA 24060, US**

72 Inventor/es:

**MENG, XIANG-JIN y  
HUANG, YAOWEI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 767 781 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Vacunas y diagnóstico de torque teno virus porcino

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a vacunas para proteger frente a la infección por torque teno virus (TTV) porcino, y a clones de ADN infecciosos de TTV porcino (TTVP) y a sus usos. La presente invención también se refiere al diagnóstico de infección por torque teno virus porcino (TTVP), particularmente al diagnóstico de infección por TTVP específica de especie o tipo, y la infección simultánea de múltiples cepas de diferentes genotipos.

**Antecedentes de la invención**

10 El torque teno virus (TTV) se descubrió por primera vez en un paciente japonés con hepatitis no A-E tras una transfusión en 1997 (Nishizawa, T., Okamoto, H., Onishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. y Mayumi, M. (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241 (1), 92-7.). Desde entonces, una gran cantidad de cepas de TTV humano y dos grupos de virus relacionados con TTV, designados posteriormente como torque teno minivirus (TTMV) y torque teno midivirus (TTMDV), se han identificado con alta prevalencia en suero y otros tejidos de seres humanos sanos (Hino, S. y Miyata, H. (2007). Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol* 17(1), 45-57; Okamoto, H. (2009a). History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 1-20). Los TTV, TTMV y TTMDV humanos son virus esféricos sin envuelta con genomas de ADN monocatenario (ADNmc) circular de 3,6-3,9, 2,8-2,9 y 3,2 kb de longitud, respectivamente, y se clasifican actualmente en una familia recién establecida, *Anelloviridae* por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV; <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>) (Biagini, P. (2009). Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 21-33). Estos tres grupos de virus relacionados con TTV presentan un alto grado de heterogeneidad genética, consistiendo cada uno en muchos genogrupos y genotipos (Biagini, P., Gallian, P., Cantaloube, J. F., Attoui, H., de Micco, P. y de Lamballerie, X. (2006). Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J Med Virol* 78 (2), 298-304; Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., Zur Hausen, H. y de Villiers, E. M. (2004). Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* 78 (14), 7498-507). La prevalencia de infecciones múltiples de TTV con diferentes genotipos, así como infecciones dobles o triples de TTV, TTMV y TTMDV se han documentado en seres humanos y se consideran un acontecimiento común en adultos humanos sanos (Niel, C., Saback, F. L. y Lampe, E. (2000). Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* 38 (5), 1926-30; Ninomiya, M., Takahashi, M., Hoshino, Y., Ichiyama, K., Simmonds, P. y Okamoto, H. (2009). Analysis of the entire genomes of torque teno midi virus variants in chimpanzees: infrequent cross-species infection between humans and chimpanzees. *J Gen Virol* 90(Pt 2), 347-58; Okamoto, H. (2009a). History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 1-20; Takayama, S., Miura, T., Matsuo, S., Taki, M., y Sugii, S. (1999). Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol* 104 (3), 626-9).

40 El TTV infecta no solo a los seres humanos, sino también a otras especies animales, incluyendo primates no humanos, tupayas, cerdos, vacas, gatos, perros y leones marinos (Biagini, P., Uch, R., Belhouchet, M., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Brisbarre, N. y de Micco, P. (2007). Genomas circulares relacionados con anellovirus identificados en muestras humanas y animales mediante el uso de Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *J Gen Virol* 88(Pt 10), 2696-701; Inami, T., Obara, T., Moriyama, M., Arakawa, Y., y Abe, K. (2000). Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: evidence for a new TT virus-like species. *Virology* 277(2), 330-5; Ng, T. F., Suedmeyer, W. K., Wheeler, E., Gulland, F., y Breitbart, M. (2009). Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *J Gen Virol* 90(Pt 5), 1256-61; Okamoto, H. (2009b). TT viruses in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 35-52; Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Tawara, A., Peng, Y., Kishimoto, J., y Wang, Y. (2001). Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *J Gen Virol* 82(Pt 9), 2041-50; Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Peng, Y., Takahashi, M., Kishimoto, J., Tanaka, T., Miyakawa, Y., y Mayumi, M. (2000a). Species-specific TT viruses in humans and non-human primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* 277(2), 368-78; Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., y Yoshikawa, A. (2002). Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* 83(Pt 6), 1291-7). Además, los chimpancés también se infectan por TTMV y TTMDV (Ninomiya, M., Takahashi, M., Hoshino, Y., Ichiyama, K., Simmonds, P. y Okamoto, H. (2009). Analysis of the entire genomes of torque teno midi virus variants in chimpanzees: infrequent cross-species infection between humans and chimpanzees. *J Gen Virol* 90(Pt 2), 347-58; Okamoto *et al.*, 2000a, citado anteriormente). Aunque los tamaños genómicos de las cepas de TTV de animales identificadas, especialmente TTV de animales no primates, son relativamente más pequeños que los de TTV humano, comparten la misma estructura genómica con un mínimo de dos marcos de lectura abiertos parcialmente solapantes (ORF1 y ORF2) traducidos a partir del ADNmc negativo, así como un tramo corto de región no traducida (UTR) con alto contenido de GC (~90%) (Okamoto, 2009b, citado anteriormente). La disposición de los ORF de TTV

es bastante similar a la del virus de la anemia del pollo (VAP) perteneciente al género *Gyrovirus* en la familia *Circoviridae* pero es diferente de los tipos de circovirus porcino (CVP) 1 (CVP1) y 2 (CVP2), que también se clasifican en la misma familia (Davidson, I. y Shulman, L. M. (2008). Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus. *Virus Res* 137(1), 1-15; Hino, S., y Prasetyo, A. A. (2009). Relationship of Torque teno virus to chicken anemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 117-30). Los genomas de CVP1 y CVP2 son ambisentido, en los que el ORF1 está codificado por la hebra genómica y el ORF2 está codificado por la hebra antígenómica (Hino y Miyata, 2007, citado anteriormente). Recientemente, el patrón de transcripción y los productos traducidos de ambos genotipos 1 y 6 de TTV humano se han identificado mediante la transfección de los clones de ADN infecciosos de TTV respectivos en células en cultivo (Mueller, B., Maerz, A., Doberstein, K., Finsterbusch, T. y Mankertz, A. (2008). B., Maerz, A., Doberstein, K., Finsterbusch, T., y Mankertz, A. (2008). Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology* 381(1), 36-45; Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., y Pintel, D. J. (2005). Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J Virol* 79(10), 6505-10). Se ha notificado la expresión de al menos seis proteínas, designadas como ORF1, ORF2, ORF1/1, ORF2/2, ORF1/2 y ORF2/3, de tres o más ARNm sometidos a corte y corte y empalme (Kakkola, L., Hedman, K., Qiu, J., Pintel, D. y Soderlund-Venermo, M. (2009). Replication of and protein synthesis by TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 53-64; Mueller *et al.*, 2008, citado anteriormente; Qiu *et al.*, 2005, citado anteriormente). Por consiguiente, es probable que, cuando se disponga de más datos disponibles con respecto a TTV animal, la presunta estructura genómica del TTV animal deba modificarse.

Aunque el TTV se identificó por primera vez en un paciente con hepatitis criptogénica, los estudios posteriores no pudieron producir evidencia de un papel significativo del TTV en la patogenia de la hepatitis u otras enfermedades (Hino y Miyata, 2007, citado anteriormente; Maggi, F. y Bendinelli, M. (2009). Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 65-90; Okamoto, 2009a, citado anteriormente). Aunque no se considera que el TTV humano se asocie directamente con una enfermedad, recientemente se demostró que el TTV porcino (PTTV) contribuye parcialmente a la inducción experimental de síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (SDNP) en combinación con la infección por el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP) (Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G. y Ellis, J. A. (2008). Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 69 (12), 1615-22), y también a la inducción experimental del síndrome de desmedro multisistémico posdestete (SDMP) combinado con infección por CVP2 en un modelo de cerdo gnotobiótico (Ellis, J. A., Allan, G. y Krakowka, S. (2008). Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 69 (12), 1608-14). Los datos sugieren que el TTV porcino es patógeno en los cerdos. Sin embargo, se necesitan más estudios en profundidad con una forma biológicamente pura del virus PTTV para caracterizar definitivamente las enfermedades y lesiones asociadas con la infección por PTTV.

En comparación con el TTV humano, la información genómica del PTTV es muy limitada. Actualmente, sólo se notifican una secuencia genómica de PTTV de longitud completa y dos de longitud casi completa de cerdos en Japón y Brasil, respectivamente (Niel, C., Diniz-Mendes, L. y Devalle, S. (2005). Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol* 86 (Pt 5), 1343-7; Okamoto *et al.*, 2002, citado anteriormente). Entre las tres cepas de PTTV conocidas, las manchas Sd-TTV31 y TTV-1p se agruparon conjuntamente en el genogrupo 1 (PTTV1), mientras que TTV-2p fue la única cepa clasificada en el genogrupo 2 (PTTV2) (Niel *et al.*, 2005, citado anteriormente). Sin embargo, la clasificación de genogrupos es un concepto vago en la taxonomía de la virología, y se necesita una clasificación adicional y más precisa de PTTV, pero sólo puede realizarse cuando se disponga de secuencias genómicas más completas disponibles de nuevas cepas de PTTV que representen múltiples genotipos.

Anteriormente se demostró que las infecciones por PTTV estaban muy extendidas en cerdos de seis países diferentes, incluyendo los Estados Unidos, Canadá, España, China, Corea y Tailandia. (McKeown, N. E., Fenaux, M., Halbur, P. G. y Meng, X. J. (2004). Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol* 104 (1-2), 113-7).

Todavía es discutible si los TTV porcinos desempeñan un papel importante en la patogenia de enfermedades porcinas específicas. En un modelo de cerdo gnotobiótico, se demostró que la infección por PTTV1 sola no desarrolló ninguna enfermedad clínica sino que indujo lesiones histológicas leves (Krakowka, S. y Ellis, J.A., 2008. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *Am J Vet Res* 69, 1623-9). Los cerdos gnotobióticos a los que se inoculó experimentalmente tanto PTTV1 como el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP) desarrollaron síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (SDNP) clínico (Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G. y Ellis, J.A., 2008. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 69, 1615-22), mientras que los cerdos a los que se inoculó PTTV1 y circovirus porcino tipo 2 (CVP2) desarrollaron el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (SDMP) agudo (Ellis *et al.*, 2008, citado anteriormente). Aunque el CVP2 se considera el principal agente causante de enfermedades asociadas con CVP (EACVP) o SDMP clínico, en España se observó una mayor prevalencia de infección por PTTV2 en cerdos afectados por SDMP con bajo o sin CVP2 que en cerdos no afectados por SDMP (Kekarainen *et al.*, 2006, citado anteriormente). Los datos en conjunto sugieren que los TTV porcinos pueden servir como cofactores involucrados en

el desencadenamiento o agravamiento de enfermedades en los cerdos.

Se ha detectado TTV porcino en muestras de suero, heces, saliva, semen y tejidos porcinos de cerdos infectados, lo que indica sus diversas rutas de transmisión, incluyendo transmisiones tanto horizontales como verticales (Kekarainen *et al.*, 2007, citado anteriormente; Pozzuto, T., Mueller, B., Meehan, B., Ringler, S.S., McIntosh, K.A., Ellis, J.A., Mankertz, A. y Krakowka, S., 2009. In utero transmission of porcine torque teno viruses. *Vet Microbiol* 137, 375-9; Sibila, M., Martínez-Guino, L., Huerta, E., Llorens, A., Mora, M., Grau-Roma, L., Kekarainen, T. y Segales, J., 2009. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Vet Microbiol* 139, 213-8). Sin embargo, la detección actual de infección por TTV porcino se basó principalmente en ensayos de PCR convencionales. Hasta el momento, no se han establecido ensayos serológicos ni un sistema de cultivo viral. En particular, las amplificaciones mediante PCR anidada de las regiones conservadas en la UTR de PTTV1 y PTTV2, respectivamente, desarrolladas por un grupo español, se han llegado a usar ampliamente (Kekarainen *et al.*, 2006, citado anteriormente). Dado que la cantidad de virus se asocia probablemente con la gravedad de las enfermedades clínicas, tal como se demostró para EACVP inducida por CVP2 (Opriessnig, T., Meng, X.J. y Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615), será importante determinar la carga viral de TTV porcino mediante PCR cuantitativa en tiempo real que la presencia de ADN de TTV mediante PCR convencional. Además, la PCR en tiempo real es más fiable, rápida y menos costosa que la PCR convencional. Recientemente, se describieron dos ensayos de PCR en tiempo real basados en sonda TaqMan para la detección y cuantificación de dos especies de TTV porcino (Brassard, J., Gagne, M.J., Houde, A., Poitras, E. y Ward, P., 2009. Development of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of porcine and bovine Torque teno virus. *J Appl Microbiol*. 14 de noviembre 2009, publicación electrónica avance de la edición impresa; Gallei, A., Pesch, S., Eskin, WS, Keller, C. y Ohlinger, VF, 2009. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet Microbiol*. 21 de diciembre de 2009, publicación electrónica avance de la edición impresa). Un inconveniente principal de los ensayos basados en sondas es que los resultados falsos negativos pueden obtenerse si las secuencias de unión a la sonda contienen mutaciones (Anderson, T.P., Werno, A.M., Beynon, K.A. y Murdoch, D.R., 2003. Failure to genotype herpes simplex virus by real-time PCR assay and melting curve analysis due to sequence variation within probe binding sites. *J Clin Microbiol* 41, 2135-7). Considerando el alto grado de heterogeneidad entre las secuencias de cepas de TTV porcinos conocidas, se esperan variaciones en las secuencias de unión a la sonda para cepas de campo de los PTTV. La PCR en tiempo real basada en verde SYBR es un método alternativo que evita este problema potencial, a pesar de su especificidad relativamente menor, que proporciona una manera universal de detectar y cuantificar las posibles variantes de TTV porcino. Además, el análisis de la curva de fusión (MCA, por sus siglas en inglés) tras PCR en tiempo real con verde SYBR garantiza la especificidad de la reacción y también permite la detección múltiple de distintos tipos de virus (Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. y Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-60). Los métodos de PCR en tiempo real con verde SYBR basados en MCA se han aplicado con éxito a varios virus humanos y veterinarios (Gibellini, D., Gardini, F., Vitone, F., Schiavone, P., Furlini, G. y Re, MC, 2006. Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. *Mol Cell Probes* 20, 223-9; Martínez, E., Riera, P., Sitja, M., Fang, Y., Oliveira, S. y Maldonado, J., 2008. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res Vet Sci* 85, 184-93; Moullisseaux, K.P., Klimpel, K.R. y Dhar, A.K., 2003. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 111, 121-7; Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H.J. y Truyen, U., 2006. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J Virol Methods* 134, 257-60).

Actualmente, se sabe poco sobre la respuesta humoral específica de PTTV. Dado que los ensayos basados en PCR no reflejan el transcurso de la infección por PTTV en los cerdos, es necesario un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) eficaz para la detección de anticuerpos séricos de PTTV para evaluar la seroprevalencia de PTTV y ayudar a caracterizar el papel de PTTV en enfermedades porcinas.

Hasta el momento, no hay vacunas de subunidades, inactivadas y vivas para los TTV porcinos disponibles. Será deseable y ventajoso expresar proteínas de la cápside de PTTV recombinante de diferentes genotipos para el desarrollo de vacunas de subunidades de PTTV, y construir clones de ADN molecular de PTTV infecciosos de diferentes genotipos para propagar formas biológicamente puras de PTTV en el sistema de cultivo celular que se usa para el desarrollo de vacunas vivas e inactivadas.

La presente invención describe proteínas recombinantes purificadas expresadas a partir de los genes de la cápside ORF1 de los genotipos o subtipos de PTTV, PTTV1a-VA, PTTV1b-VA y PTTV2c-VA en un sistema de expresión bacteriano y el uso de estas proteínas de la cápside recombinantes como vacunas de subunidades contra infecciones por PTTV. Las proteínas de la cápside recombinantes para el uso como vacunas de subunidades pueden expresarse en un sistema de expresión de baculovirus u otros sistemas de vectores de expresión.

Según un primer aspecto de la invención, existe una composición inmunogénica que comprende una proteína según la SEQ ID NO: 16.

Según un aspecto adicional de la presente invención, la composición inmunogénica contiene además un adyuvante.

La presente invención puede usarse en un método de inmunización de un cerdo contra la infección viral de PTTV, que comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna que comprende una secuencia polipeptídica inmunogénica de la invención.

- 5 El método puede comprender administrar la vacuna por vía parenteral, por vía intranasal, por vía intradérmica o por vía transdérmica al cerdo. El método también puede comprender la administración de la vacuna por vía intralinfoide o por vía intramuscular al cerdo.

- 10 La presente invención proporciona un método para diagnosticar la infección por PTTV, que comprende inmovilizar una proteína representada por la SEQ ID NO: 16; poner en contacto una muestra de suero de un cerdo sospechoso de presentar infección por PTTV con la proteína inmovilizada y detectar el anticuerpo capturado específico para la proteína.

La presente invención describe tres ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) normalizados para diagnosticar infecciones por PTTV y detectar anticuerpos en suero de cerdos infectados por los genotipos de PTTV, PTTV1a-VA, PTTV1b-VA y todos los subtipos conocidos en la especie de PTTV 2.

- 15 Las pruebas de diagnóstico ELISA se basan en la proteína de la cápside ORF1 recombinante expresada en bacterias o en baculovirus de los genotipos de PTTV, PTTV1a-VA, PTTV1b-VA y PTTV2c-VA.

Según otro aspecto de la presente invención, la detección del anticuerpo capturado se realiza mediante inmunotransferencia de tipo Western. Según aún otro aspecto de la presente invención, la detección del anticuerpo capturado se realiza mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

20 **Breve descripción de los dibujos**

Las características de la invención mencionadas anteriormente se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, leída junto con los dibujos en los que:

- 25 Las figuras 1A y 1B representan el diagrama esquemático de estructuras genómicas, estrategias para la clonación genómica y ensamblajes de cuatro cepas prototipo estadounidenses de cepas de virus TTV porcino del grupo 1 (especie 1) y del grupo 2 (especie 2);

la figura 2 representa la distribución mediante PASC (pairwise sequences comparisons, comparaciones de secuencias por parejas) de comparaciones de secuencias de nucleótidos de 121 cepas de TTV disponibles en la base de datos GenBank. Se presentan los géneros, las especies, los tipos, subtipos y las variantes y su porcentaje correspondiente de identidades de secuencia de nucleótidos;

- 30 la figura 3A ilustra un árbol filogenético construido mediante el método de unión de vecinos basándose en las secuencias de nucleótidos genómicas de longitud completa;

la figura y 3B ilustra un árbol filogenético construido basándose en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF1 entre siete cepas de TTV porcino;

- 35 la figura y 3C ilustra un árbol filogenético construido basándose en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF1/1 entre siete cepas de TTV porcino;

la figura 3D ilustra un árbol filogenético construido basándose en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF2 entre siete cepas de TTV porcino;

Las figuras y 3E ilustra un árbol filogenético construido basándose en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF2/2 entre siete cepas de TTV porcino;

- 40 la figura 4 representa una alineación de las secuencias de aminoácidos de longitud completa de ORF1 entre siete cepas de PTTV;

la figura 5 representa una alineación de las secuencias de aminoácidos de longitud completa de ORF2 entre siete cepas de PTTV;

- 45 la figura 6A ilustra las curvas de fusión de los productos de PCR en tiempo real de PTTV1 después de 40 ciclos de amplificaciones del molde patrón respectivo (indicado en color azul) y 20 muestras de suero porcino;

la figura 6B ilustra las curvas de fusión de los productos de PCR en tiempo real de PTTV2 después de 40 ciclos de amplificaciones del molde patrón respectivo y 20 muestras de suero porcino;

las figuras 7A-7E ilustran el análisis de la curva de fusión (MCA) de la PCR en tiempo real dúplex basada en verde SYBR de PTTV1/PTTV2;

la figura 8 representa una alineación de secuencias de nucleótidos ubicadas en la parte N-terminal del supuesto ORF1 entre siete cepas de PTTV;

las figuras 9A y 9B representan perfiles de hidrofiliidad y regiones conservadas de los cuatro TTV2 porcinos conocidos;

- 5 las figuras 10A-10C ilustran la expresión y la purificación de la proteína de la cápside ORF1 de PTTV2c recombinante;

las figuras 11A-11C muestran resultados representativos del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de muestras de suero porcino seleccionadas;

la figura 12 ilustra la consistencia de la inmunotransferencia de tipo Western basada en PTTV2c-ORF1 y ELISA;

- 10 la figura 13 muestra gráficos de cajas y bigotes del nivel de anticuerpos séricos de PTTV2 por carga viral en 138 cerdos de diferentes fuentes;

la figura 14A ilustra una evaluación retrospectiva de la carga viral de PTTV2;

la figura 14B ilustra el nivel de anticuerpos contra la proteína de la cápside ORF1 de PTTV2 en 10 cerdos que crecen desde la llegada hasta dos meses después de la llegada;

- 15 las figuras 15A-15C ilustran la expresión y purificación de la proteína de la cápside ORF1 recombinante de PTTV1a y PTTV1b; y

la figura 16 muestra ejemplos de análisis de inmunotransferencia de tipo Western basados en PTTV1a-ORF1 de muestras de suero porcino seleccionadas de una granja de Wisconsin.

#### Descripción detallada de la invención

- 20 En la figura 1A, los genomas de PTTV1 y PTTV2 se muestran en negrita y los tamaños y las direcciones de los cuatro supuestos ORF (ORF1, ORF2, ORF1/1 y ORF2/2) se indican con flechas. También se muestran las regiones ricas en GC. Los arcos de línea discontinua A y D representan las regiones usadas para la detección de PTTV1 y PTTV2 a partir de muestras de suero y semen mediante PCR anidada, respectivamente. Los arcos de línea discontinua B y C representan los dos fragmentos de PCR solapantes para la clonación genómica de PTTV1, mientras que los arcos de línea discontinua E y F representan los dos fragmentos de PCR solapantes para la clonación genómica de PTTV2. Las ubicaciones de los cebadores usados en el estudio (véase la tabla 1) también se muestran en las posiciones correspondientes.

- Se usó una muestra de suero de jabalí (SR n.º 5) que resultó ser positiva tanto para PTTV1 como para PTTV2 en la primera tanda de PCR, por tanto indicativa de una mayor carga viral, para la posterior clonación genómica de longitud completa de PTTV. Sorprendentemente, los intentos iniciales de usar dos conjuntos de cebadores (NG372/NG373 y NG384/NG385) de una PCR inversa (Okamoto *et al.*, 2002, citado anteriormente) diseñada para la clonación de la primera cepa de PTTV Sd-TTV31 para amplificar el ADN genómico viral no tuvieron éxito. No se obtuvo ningún producto de PCR después de varios ensayos. Basándose en la secuencia inicial de la región A de PTTV1 y la región D de PTTV2, se diseñaron posteriormente dos nuevas parejas de cebadores (TTV1-If (SEQ ID NO: 1)/TTV1-2340R (SEQ ID NO: 2) y TTV1-2311F (SEQ ID NO: 3)/TTV1-IR (SEQ ID NO: 4)) para amplificar las regiones B y C que abarcan el genoma de PTTV1 supuesto, y dos parejas adicionales de cebadores (TTV2-IF (SEQ ID NO: 5)/TTV2-2316R (SEQ ID NO: 6) y TTV2-GCF (SEQ ID NO: 7)/TTV2-IR (SEQ ID NO: 8)) para amplificar las regiones E y F que abarcan el genoma de PTTV 2 supuesto, respectivamente (figura 1 A y tabla 1). Los cebadores TTV1-2340R (SEQ ID NO: 2) y TTV1-2311F (SEQ ID NO: 3) se dedujeron a partir de una secuencia común en las manchas de PTTV1, Sd-TTV31 (Okamoto *et al.*, 2002, citado anteriormente) y TTV-1p (Niel *et al.*, 2005) que está ausente en la cepa de PTTV2, TTV-2p (Niel *et al.*, 2005, citado anteriormente), mientras que los cebadores TTV2-2316R (SEQ ID NO: 6) y TTV2-GCF (SEQ ID NO: 7) se dedujeron a partir de una secuencia de la cepa TTV-2p que está ausente en las dos cepas de PTTV1. Los cuatro productos de PCR diferentes resultantes con tamaños esperados se insertaron cada uno en un vector de clonación de extremos romos, y los plásmidos recombinantes resultantes se transformaron en *Escherichia coli*. Se identificaron de ocho a quince clones bacterianos positivos (con color blanco) para cada constructo que representan los fragmentos B, C, E y F y posteriormente se secuenciaron.

Tabla 1. Cebadores oligonucleotídicos usados para amplificaciones de PCR anidada y PCR genómica de TT virus porcinos

ES 2 767 781 T3

ID del cebador	Secuencia (5' a 3')	Usado para:
TTV1-mF (SEQ ID NO: 45)	TACACTTCCGGGTTTCAGGAGGCT	Detección de TTV1 porcino
TTV1-mR (SEQ ID NO: 46)	ACTCAGCCATTCCGGAACCTCAC	Detección de TTV1 porcino
TTV1-nF (SEQ ID NO: 47)	CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC	Detección de TTV1 porcino
TTV1-nR (SEQ ID NO: 48)	TACTTATATTCGCTTTCGTGGGAAC	Detección de TTV1 porcino
TTV2-mF (SEQ ID NO: 49)	AGTTACACATAACCACCAAACC	Detección de TTV2 porcino
TTV2-mR (SEQ ID NO: 50)	ATTACCGCTGCCCGATAGGC	Detección de TTV2 porcino
TTV2-nF (SEQ ID NO: 51)	CCAAACCACAGGAAACTGTGC	Detección de TTV2 porcino
TTV2-nR (SEQ ID NO: 52)	CTTGACTCCGCTCTCAGGAG	Detección de TTV2 porcino
TTV1-IF (SEQ ID NO: 1)	CATAGGGTGTAACCAATCAGATTTAAGGCGTT	Clonación genómica (fragmento B)
TTV1-2340R (SEQ ID NO: 2)	GGTCATCAGACGATCCATCTCCCTCAG	Clonación genómica (fragmento B)
TTV1-2311F (SEQ ID NO: 3)	CTTCTGAGGGAGATGGATCGTCTGATGA	Clonación genómica (fragmento C)
TTV1-1R (SEQ ID NO: 4)	TTGAGCTCCCGACCAATCAGAATTGACT	Clonación genómica (fragmento C)
TTV2-IF (SEQ ID NO: 5)	TTGTGCCGGAGCTCCTGAGAGC	Clonación genómica (fragmento E)
TTV2-2316R (SEQ ID NO: 6)	AGGTGCTTGAGGAGTCGTCGCTTG	Clonación genómica (fragmento E)
TTV2-GCF (SEQ ID NO: 7)	CTCAAGCACGAGCAGTGGATCCTCTCA	Clonación genómica (fragmento F)
TTV2-IR (SEQ ID NO: 8)	TACCCAGGCGGTTAGACACTCAGCTCT	Clonación genómica (fragmento F)

Inesperadamente, se identificaron dos grupos de datos de secuencia de cada constructo, lo que indica que existen dos tipos de PTTV en el genogrupo 1 y el genogrupo 2 del mismo cerdo. Con el fin de diferenciar y ensamblar las cuatro cepas de PTTV, se realizaron comparaciones de secuencias junto con las tres cepas de PTTV conocidas, Sd-TTV31, TTV-1p y TTV-2p (figuras 1B y 1C).

5

La figura 1B ilustra la diferenciación y el ensamblaje de secuencias genómicas de longitud completa de las cepas de PTTV1, PTTV1a-VA y PTTV1b-VA con los fragmentos B y C de PCR que se clonaron posteriormente. Los codones de iniciación de ORF1 y ORF2 en el fragmento B, así como los codones de terminación de ORF1 en el fragmento C

están marcados con “^” o “\*”. También se muestran las secuencias correspondientes de dos cepas de PTTV1 conocidas, Sd-TTV31 y TTV-1p. Las secuencias conservadas están sombreadas y los guiones indican deleciones de nucleótidos.

5 Para PTTV1, el codón de iniciación ATG y el codón de terminación TGA del supuesto ORF1 se ubicaron en los fragmentos B y C, respectivamente (figura 1B). Las posiciones de los codones se diferenciaron en dos grupos de PTTV1, el primero idéntico a Sd-TTV31 y el segundo idéntico a TTV-1p (figura 1B). Además, los codones de iniciación de ORF2 en los dos grupos también se ubicaron en diferentes posiciones que concuerdan con la de ORF1. Además, los análisis filogenéticos usando cuatro secuencias diferentes de la región B (dos de los datos de secueñación y dos de las cepas Sd-TTV31 y TTV-1p) y cuatro secuencias diferentes de la región C respaldaron que la primera secuencia estaba agrupada con Sd-TTV31 y la segunda estaba agrupada con TTV-1p (datos no mostrados). Por tanto, pudieron diferenciarse y ensamblarse dos grupos de datos de secuencia de ambos fragmentos B y C en dos genomas de PTTV1 completos que se designaron como cepas PTTV1a-VA (SEQ ID NO: 9) y PTTV1b-VA (SEQ ID NO: 10), respectivamente (figura 1B).

15 La figura 1C ilustra la diferenciación y el ensamblaje de secuencias genómicas de longitud completa de las cepas de PTTV2, PTTV2b-VA y PTTV2c-VA, con los fragmentos E y F de PCR que se clonaron posteriormente. Se incluye la secuencia correspondiente de la cepa TTV-2p y las secuencias conservadas están sombreadas. Los guiones indican deleciones de nucleótidos. Los nucleótidos únicos dentro de la región solapante (con recuadro de línea discontinua) para cada cepa (unos nucleótidos “AG” continuos para PTTV2b-VA (SEQ ID NO: 11) y dos nucleótidos “A” y “G” individuales para PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 12)) se muestran, respectivamente.

20 La diferenciación de las dos cepas de PTTV2 fue más fácil. Dos grupos de datos de secuencia de los fragmentos E y F, respectivamente, compartieron unos nucleótidos “AG” continuos únicos ubicados en la región solapante de dos fragmentos de PCR (figura 1C). La secuencia genómica de longitud completa ensamblada representaba una cepa de PTTV2 y se designó como PTTV2b-VA (SEQ ID NO: 11). De manera similar, la secuencia genómica completa de una segunda cepa designada como PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 12) se ensambló basándose en dos nucleótidos “A” y “G” únicos individuales compartidos en la región solapante por otro conjunto de datos de secuencia de los fragmentos E y F, respectivamente (figura 1C). Los análisis filogenéticos usando cuatro secuencias de los fragmentos E y F junto con las dos secuencias correspondientes de TTV-2p también respaldaron esta asignación (datos no mostrados).

30 La presente invención divulga cuatro genotipos o subtipos de virus TTV porcino aislados que están asociados con infecciones virales en cerdos. También se divulgan en el presente documento los genotipos o subtipos de virus TTV porcino PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA y PTTV2c-VA, los genotipos o subtipos de virus que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 9 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO: 10 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO: 11 (PTTV2b-VA), y SEQ ID NO: 12 (PTTV2c-VA), su hebra complementaria o equivalente funcional. Se entenderá que la secuencia de nucleótidos específica derivada de cualquier TTV porcino tendrá ligeras variaciones que existen de manera natural entre virus individuales. Estas variaciones en las secuencias pueden observarse en deleciones, sustituciones, inserciones y similares.

40 La estructura genómica propuesta para cada una de las cuatro cepas de PTTV se analizó con detalle y se resumió en la tabla 2, junto con las tres cepas de PTTV conocidas, Sd-TTV31, TTV-1p y TTV-2p. Las cuatro cepas estadounidenses de PTTV tienen un tamaño genómico similar de 2.878 pb (PTTV1a-VA, SEQ ID NO: 9), 2.875 pb (PTTV1b-VA, SEQ ID NO: 10), 2.750 pb (PTTV2b-VA, SEQ ID NO: 11) y 2.803 pb (PTTV2c-VA, SEQ ID NO: 12), respectivamente. Tanto PTTV1a-VA (SEQ ID NO: 9) como Sd-TTV31 tienen la misma longitud genómica. Las secuencias publicadas de las cepas TTV-1p y TTV-2p tienen muchos nucleótidos indeterminados en la región rica en GC de la UTR. Después del llenado artificial de estos nucleótidos con las secuencias consenso correspondientes a PTTV1 y PTTV2, se demostró que TTV-1p está más estrechamente relacionado con PTTV1b-VA (SEQ ID NO: 10), y que TTV-2p está más estrechamente relacionado con PTTV2b-VA (SEQ ID NO: 11) en cuanto a longitud genómica, respectivamente (datos no mostrados).

50 Las secuencias genómicas ensambladas de los genotipos o subtipos del virus TTV porcino, PTTV1a-VA (SEQ ID NO: 9), PTTV1b-VA (SEQ ID NO: 10), PTTV2b-VA (SEQ ID NO: 11) y PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 12) se envían a Genbank® (Nucleic Acids Research, enero de 2008; 36 (problema de la base de datos): D25-30) con los números de registro GU456383, GU456384, GU456385 y GU456386, respectivamente.

Tabla 2. Comparación de la organización genómica y los ORF de las siete cepas de TTV porcino

ES 2 767 781 T3

Virus	Especie 1 de TTV porcino		Especie 2 de TTV porcino				
	Tipo 1a	Tipo 1b	Subtipo 2a		Subtipo 2b	Subtipo 2c	
Cepa	PTTV1a-VA	Sd-TTV31	PTTV1b-VA	TTV-1p	TTV-2p	PTTV2b-VA	PTTV2c-VA
País	Estados Unidos	Japón	Estados Unidos	Brasil	Brasil	Estados Unidos	Estados Unidos
Longitud total (nt)	2878	2878	2875	Incompleto	Incompleto	2750	2803
N.º de registro GenBank	GU456383	AB076001	GU456384	AY823990	AY823991	GU456385	GU456386
Caja TATA	288-291	288-291	288-291	288-291	233-236	233-236	285-288
Supuesto extremo 5' de ARNm	316	316	316	316	261	261	313
ORF1							
Tamaño (aa)	635	635	639	637	624	625	625
N.º de exón 1	1	1	1	1	1	1	1
Iniciación	534	534	517	517	476	476	528
Terminación	2441	2441	2436	2430	2350	2353	2405
ORF2							
Tamaño (aa)	73	73	72	72	68	68	68
N.º de exón 1	1	1	1	1	1	1	1
Iniciación	430	430	428	428	393	393	445
Terminación	651	651	646	646	599	599	651
ORF1/1							
Tamaño (aa)	174	174	182	182	178	178	178
N.º de exón 2	2	2	2	2	2	2	2
Iniciación	534	534	517	517	476	476	528
Corte y empalme	647/648	647/648	642/643	642/643	595/596	595/596	647/648
2030/2031	2030/2031	2030/2031	2013/2014	2007/2008	1933/1934	1936/1937	1988/1989
Terminación	2441	2441	2436	2430	2350	2353	2405
ORF2/2 (ORF3)							
Tamaño (aa)	224	224	228	228	199	199	199
N.º de exón 2	2	2	2	2	2	2	2
Iniciación	430	430	428	428	393	395	445
Corte y empalme	647/648	647/648	642/643	642/643	595/596	595/596	647/648
2030/2031	2030/2031	2030/2031	2013/2014	2007/2008	1933/1934	1936/1937	1988/1989
Terminación	2487	2487	2485	2479	2330	2333	2385
Señal de poliadenilación (AATAAA)	2458-2463	2458-2463	2462-2467	2456-2461	2473-2478	2476-2481	2528-2533

Los números (excepto los tamaños del genoma de longitud completa, los ORF y los números de exón) indican las posiciones de nucleótido (nt) en el genoma de las cepas de PTTV respectivas.

5 Dos estudios recientes han identificado los ARNm virales transcritos y la expresión de al menos seis proteínas virales durante la replicación de TTV humano (Mueller *et al.*, 2008, citado anteriormente; Qiu *et al.*, 2005, citado anteriormente), que es más que el número predicho de ORF codificados por TTV humano (Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T. y Sugai, Y. (2000b). TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* 279 (2), 700-7), por tanto, se incluyó la nueva información genómica de TTV humano para su comparación con las secuencias de PTTV. Los extremos 5' de los transcritos de ARNm de la cepa P/1C1 de TTV humano se mapearon en una "A" que está 25 nt en el sentido de 3' de la caja TATA (Mueller *et al.*, 2008, citado anteriormente). Este punto de partida, su secuencia adyacente (CGAATGGCTGAGTTTATGCCGC (SEQ ID NO: 39); el punto de partida estaba subrayado) y la distancia a la caja TATA en el sentido de 5' (24 nt; tabla 2) están muy conservados en las siete cepas de PTTV, lo que sugiere que PTTV y TTV humano pueden usar un extremo 5' común de ARNm para la traducción.

15 Se identificaron cinco regiones completamente conservadas adicionales en las proximidades de la caja TATA entre las siete cepas de PTTV. Dos regiones de 11 nt cada una (AGTCCTCATTT (SEQ ID NO: 40) y AACCAATCAGA (SEQ ID NO: 41)) están ubicadas en el sentido de 5' de la caja TATA, mientras que las tres regiones restantes (CTGGGCGGGTGCCGGAG de 17 nt (SEQ ID NO: 42); CGGAGTCAAGGGGC de 14 nt (SEQ ID NO: 43); TATCGGGCAGG de 11 nt (SEQ ID NO: 44)) están ubicadas entre el extremo 5' propuesto del ARNm y el codón de

iniciación de ORF2. Estas secuencias específicas de PTTV conservadas pueden contener los elementos comunes que regulan la expresión génica viral.

Anteriormente, se propusieron tres ORF (ORF 1-3) en el genoma de las tres cepas de PTTV conocidas, respectivamente (Niel *et al.*, 2005, citado anteriormente; Okamoto *et al.*, 2002, citado anteriormente). Las cuatro cepas de PTTV prototipo estadounidenses identificadas en este estudio presentan esta estructura. El ORF3 correspondiente en TTV humano ha sido renombrado como ORF2/2 ya que se inicia en el mismo ATG en ORF2 y permanece en el mismo ORF (extendiendo ORF2) después del corte y empalme (figura 1A) (Mueller *et al.*, 2008, citado anteriormente; Qiu *et al.*, 2005, citado anteriormente). Se sigue la nomenclatura de TTV humano para revisar la clasificación de PTTV en este estudio. ORF1/1 de TTV humano es una proteína viral identificada recientemente que está codificada por dos exones en ORF1 (Qiu *et al.*, 2005, citado anteriormente). ORF1/1 comparte las partes N y C-terminal idénticas con ORF1. La homólogo de ORF1/1 de PTTV se identificó fácilmente en las siete cepas de PTTV (figura 1A y tabla 2).

El ORF1 y el ORF2 están codificados por un ARNm viral de ~2,8 kb, mientras que el ORF1/1 y el ORF2/2 están codificados por un ARNm viral sometido a corte y empalme con ~1,2 kb en TTV humano (Mueller *et al.*, 2008, citado anteriormente; Qiu *et al.*, 2005, citado anteriormente). Dado que estos cuatro ORF también se dedujeron en los genomas de PTTV, y dado que las secuencias y posiciones de los supuestos sitios donantes y aceptores de corte y empalme en las siete cepas de PTTV están muy conservadas (tabla 2), se especula que el TTV porcino probablemente también codifica los dos ARNm correspondientes.

La mayoría de las cepas de TTV humano comparten una similitud genética con el VAP, que codifica para una proteína inductora de apoptosis de TTV (PIAT) en la que su homólogo de VAP se denominó apoptina (de Smit, M. H. y Noteborn, M. H. (2009). Apoptosis-inducing proteins in chicken anemia virus and TT virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 131-49). El ORF de PIAT está incrustado dentro del ORF2. Sin embargo, la PIAT correspondiente no existe en TTV porcino. Un estudio reciente mostró que se requería la expresión de apoptina o PIAT para la replicación de VAP en células en cultivo (Prasetyo, A. A., Kamahora, T., Kuroishi, A., Murakami, K. y Hino, S. (2009). Replication of chicken anemia virus (CAV) requires apoptin and is complemented by VP3 of human torque teno virus (TTV). *Virology* 385 (1), 85-92).

Las comparaciones de secuencias por parejas (PASC) es un método útil que representa gráficamente la distribución de frecuencias de porcentajes de identidad de secuencia de nucleótidos por parejas de todas las secuencias genómicas disponibles de virus en la misma familia (Bao, Y., Kapustin, Y. y Tatusova, T. (2008). *Virus Classification by Pairwise Sequence Comparison (PASC)*. En "Encyclopedia of Virology, 5 vols." (B. W. J. Mahy, y M. H. V. Van Regenmortel, Eds.), Vol. 5, págs. 342-8. Elsevier, Oxford). Los diferentes picos generados por el programa PASC representan generalmente grupos de géneros, especies, tipos, subtipos y cepas de virus (figura 2). En este estudio, se realizaron análisis mediante PASC de TTV usando 121 secuencias genómicas de longitud completa de cepas relacionadas con TTV humanos y animales disponibles en la base de datos de GenBank (figura 2). Suponiendo que los miembros de TTV se clasifican en una familia independiente, *Anelloviridae*, los dos picos principales, con identidades de secuencia de nucleótidos del 36-55% y el 55-67%, representan grupos de géneros y especies, respectivamente (figura 2). Por consiguiente, un tipo de TTV se define como un grupo de TTV que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos del 67-85% mientras que un subtipo de TTV puede definirse como un grupo de secuencias de TTV que comparten una identidad de secuencia de nucleótidos del 85-95%. Las cepas de TTV que comparten una identidad de secuencia de nucleótidos de más del 95% pueden clasificarse adicionalmente en variantes (figura 2). Se ha propuesto una clasificación similar usando secuencias de 103 aislados de TTV por Jelcic *et al* (Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., Zur Hausen, H. y de Villiers, E. M. (2004). Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* 78 (14), 7498-507).

Los criterios propuestos para la clasificación de TTV se aplicaron a los análisis filogenéticos de las secuencias genómicas de las 4 cepas prototipo estadounidenses de PTTV y las otras 3 cepas de PTTV conocidas. La comparación por parejas de secuencias de nucleótidos de longitud completa entre estas cepas mostró que las cuatro cepas de PTTV1 tienen una identidad de secuencia de nucleótidos del 54,0-56,4% en comparación con las tres cepas de PTTV2 (tabla 3). Por tanto, el "genogrupo" previamente designado de PTTV en la bibliografía probablemente será más apropiado de designar como "especie", y PTTV1 y PTTV2 probablemente deben representar las especies 1 y 2 de TTV porcino, respectivamente. La especie 1 de PTTV consiste en dos tipos de virus designados como tipo 1a (incluyendo Sd-TTV31 y PTTV1a-VA (SEQ ID NO: 9)) y tipo 1b (incluyendo TTV-1p y PTTV1b-VA (SEQ ID NO: 10)), respectivamente, dado que la identidad de secuencia de nucleótidos entre estos dos tipos de virus es de entre el 69,8-70,7% (tabla 3). Sd-TTV31 y TTV1a-VA (SEQ ID NO: 9) se reconocen como cepas variantes de la misma especie debido a su mayor identidad de secuencia (95,1%). Sin embargo, las dos cepas de tipo 1b, TTV-1p y PTTV1b-VA (SEQ ID NO: 10), pueden pertenecer a dos subtipos diferentes (identidad de secuencia de nucleótidos = 86,4%). Para la especie 2 de PTTV, es probable que tres cepas se clasifiquen en subtipos independientes (TTV-2p para el subtipo 2a, PTTV2b-VA (SEQ ID NO: 11) para el subtipo 2b, y PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 12) para el subtipo 2c, respectivamente) basándose en su identidad de secuencia de nucleótidos del 86,5-90,9%. Este nuevo sistema de clasificación propuesto para PTTV era claramente evidente en el árbol filogenético (figura 3A). Los árboles filogenéticos construidos basándose en las secuencias de aminoácidos deducidas de ORF1, ORF1/1, ORF2 y ORF2/2 de PTTV también concordaron con esta clasificación propuesta

(figuras 3B a 3E).

Tabla 3. Comparación de secuencias por parejas de la secuencia genómica de longitud completa de las siete cepas de TTV porcino

	Especie 1 de TTV porcino				Especie 2 de TTV porcino		
	Tipo 1a		Tipo 1b		Subtipo 2a	Subtipo 2b	Subtipo 2c
	PTTV1a-VA	Sd-TTV31	PTTV1b-VA	TTV-1p	TTV-2p	PTTV2b-VA	PTTV2c-VA
Tipo 1a							
PTTV1a-VA -	95,1	70,5	69,8	55,7	55,1	56,2	
Sd-TTV31	-	70,7	70,1	55,9	56,0	56,4	
Tipo 1b							
PTTV1b-VA		-	86,4	54,0	54,7	55,2	
TTV-1p			-	55,2	54,7	55,4	
Subtipo 2a							
TTV-2p				-	86,5	86,8	
Subtipo 2b							
PTTV2b-VA					-	90,9	
Subtipo 2c							
PTTV2c-VA							-

Los datos se generaron usando el programa PASC, y los valores indican el % de identidades de secuencia de nucleótidos.

- 5 Se encuentran mutaciones y deleciones y/o inserciones únicas dispersas por todos los genomas entre especies, tipos y subtipos de PTTV. Por ejemplo, la ubicación de los codones de iniciación y terminación de ORF1 y los codones de iniciación de ORF2 entre los tipos 1a y 1b de PTTV, que se mostró en la figura 1B tal como se mencionó anteriormente, son diferentes. Las dos cepas de PTTV1b también tienen una deleción de 2 codones después del inicio de ORF2 en comparación con PTTV 1a (figura 1B).
- 10 Notablemente, tanto TTV-2p como PTTV2b-VA tienen una gran deleción de 52 nt, que está a 39 nt en el sentido de 5' de la primera secuencia conservada de 11 nt (AGTCCTCATTT (SEQ ID NO: 40)) en la UTR, en comparación con PTTV2c-VA. Debido a esta deleción, el tamaño genómico de PTTV2b-VA (probablemente también de TTV-2p) fue significativamente menor que el de PTTV2c-VA (tabla 2). Se han aislado varios clones de TTV humano "subvirales" de muestras de suero que se consideran genomas de TTV de longitud completa puesto que los ORF en la mayoría
- 15 de estas moléculas subvirales generalmente permanecen intactos (de Villiers *et al.*, 2009; Leppik *et al.*, 2007). Tienen longitudes variables en la UTR que se delecionan total o parcialmente. La situación de TTV-2p y PTTV2b-VA parece asemejarse a la de las moléculas subvirales de TTV humano, lo que implica que los subtipos PTTV2a y PTTV2b podrían ser moléculas subvirales derivadas del subtipo PTTV2c. Es de destacar que la secuencia 3'-
- 20 terminal de un cebador de PCR anidada TTV2-nF (tabla 1) que se usa comúnmente para la detección de PTTV2 de muestras de campo por otros grupos (Ellis *et al.*, 2008, citado anteriormente; Kekarainen *et al.*, 2007, citado anteriormente; Kekarainen *et al.*, 2006, citado anteriormente; Krakowka *et al.*, 2008, citado anteriormente) está ubicada a ambos lados de la deleción. Por tanto, el ensayo de PCR anidada actual para la detección de PTTV2 probablemente no sea suficiente para identificar las cepas genéticamente diversas del subtipo PTTV2c.
- 25 La fuente de la cepa viral aislada son muestras de suero, heces, saliva, semen y tejido de cerdos que tienen la infección viral por TTV porcino. Sin embargo, se contempla que la tecnología de ADN recombinante puede usarse para duplicar y sintetizar químicamente la secuencia de nucleótidos. Por tanto, la divulgación en el presente documento abarca el polinucleótido aislado que comprende, pero no se limita a, una secuencia de nucleótidos
- 30 expuesta en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o su hebra complementaria; un polinucleótido que se hibrida con y que es complementario en al menos el 67% a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, preferiblemente complementaria en el 85%, o más preferiblemente complementaria en el 95%; o un fragmento inmunogénico seleccionado del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de la proteína ORF1 expuesta en SEQ ID NO: 13 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO: 14 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO: 15 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO: 16 (PTTV2c-VA), una secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2 expuesta en SEQ ID NO: 17 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO: 18 (PTTV1b-VA), SEQ ID
- 35 NO: 19 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO: 20 (PTTV2c-VA), una secuencia de aminoácidos de la proteína ORF1/1 expuesta en SEQ ID NO: 21 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO: 22 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO: 23 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO: 24 (PTTV2c-VA), una secuencia de aminoácidos de la proteína ORF2/2 expuesta en SEQ ID NO: 25 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO: 26 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO: 27 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO: 28 (PTTV2c-VA) Las regiones o fragmentos codificantes inmunogénicos o antigénicos pueden determinarse mediante técnicas conocidas en la

técnica y luego usarse para producir anticuerpos monoclonales o policlonales para el examen de inmunorreactividad u otros propósitos de diagnóstico. La divulgación en el presente documento abarca además la proteína inmunogénica purificada codificada por los polinucleótidos aislados. De manera deseable, la proteína puede ser una proteína ORF1 o una proteína ORF2 aislada o recombinante de al menos uno de los subtipos de TTV porcino aislados anteriores, de manera más deseable la proteína ORF1.

Se cree que el ORF1 de TTV porcino codifica para una proteína estructural y asociada a la replicación (Maggi, F. y Bendinelli, M. (2009). Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 65-90). Los productos que codifican para ORF1 de siete cepas de PTTV tienen una longitud de 624-635 aa y presentan un alto número de residuos de arginina en el extremo N-terminal que se cree que tienen actividad de unión al ADN (figura 4). En la figura 4, las secuencias conservadas están sombreadas. Los guiones indican deleciones de aminoácidos. Los motivos RCR están recuadrados con líneas continuas. Tres HVR (PTTV1-HVR 1, 2 y 3) de cepas de PTTV1 y dos HVR (PTTV2-HVR 1 y 2) de cepas de PTTV2 están recuadradas con líneas discontinuas. Los límites de conexión de ORF1/1 se indican mediante flechas, los motivos de replicación en círculo rodante (RCR) predichos (Ilyina, T. V. y Koonin, E. V. (1992). Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res* 20 (13), 3279-85) se presentan en diferentes posiciones en diferentes tipos y subtipos de PTTV que pueden ser específicos de tipo o subtipo. El motivo III de RCR (YxxK) está conservado en el tipo 1a de PTTV (posiciones de aa 14-17 de PTTV1a-VA, SEQ ID NO: 13) y cepas de tipo 1b (posiciones de aa 379-382 de PTTV1b-VA, SEQ ID NO: 14), respectivamente, mientras que el mismo motivo conservado identificado en las tres cepas de PTTV2 está ubicado en una posición 482-485 de PTTV2b-VA, SEQ ID NO: 15 (figura 4). Tanto PTTV2b-VA, SEQ ID NO: 15 como PTTV2c-VA, SEQ ID NO: 16 también tienen un motivo II de RCR conservado (HxQ) en las posiciones de aa 331-333 de PTTV2b-VA que está ausente en TTV-2p (figura 4).

Las proteínas ORF1 de las cepas de PTTV entre las especies 1 y 2 comparten una identidad de secuencia de aa muy baja con sólo del 22,4 al 25,8%, lo que dificulta la identificación de secuencias de aa conservadas significativamente entre las dos especies (figura 4). En la especie 1 de PTTV, la identidad de aa de ORF1 entre las cepas tipo 1a y 1b es del 50,3-52,7%. Se identificaron tres regiones hipervariables (HVR) principales, HVR 1 a 3 de PTTV1, con un número relativamente alto de sustituciones de aa, entre las cuatro cepas de PTTV1, mientras que se observaron dos HVR (PTTV2-HVR 1 y 2) entre las tres cepas de PTTV2 (figura 4). Las tres cepas de PTTV2 tienen una deleción de aproximadamente 20 aa en la región PTTV1-HVR 1 correspondiente. Además, las dos HVR de PTTV2 están dentro de la región PTTV1-HVR 3 correspondiente (figura 4). Estas HVR están ubicadas sólo en el ORF1 pero no en el ORF1/1 truncado. Probablemente desempeñan un papel en la evasión de la vigilancia inmunitaria del huésped y ayudar a PTTV a establecer una infección persistente, tal como sugieren los estudios de TTV humano.

Las secuencias de aa de ORF2 diferían considerablemente entre las cuatro cepas de PTTV1 (PTTV1a-VA SEQ ID NO: 17; PTTV1b-VA SEQ ID NO: 18) y las tres de PTTV2 (PTTV2b-VA SEQ ID NO: 19; PTTV2c-VA SEQ ID NO: 20) (figura 5). Sin embargo, comparten un motivo conservado similar a proteína-tirosina fosfatasa (PTPasa) ( $W_xH_xC_xC_xH$ ) en el extremo N-terminal (figura 4). Este motivo también está conservado entre todas las cepas de TTV, TTMV y TTMDV humanos, así como VAP. La proteína ORF2 de TTMV o VAP también presentó una actividad serina/treonina fosfatasa (S/T PTPasa) (Peters, M. A., Jackson, D. C., Crabb, B. S. y Browning, G. F. (2002). Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem* 277 (42), 39566-73). Se cree que la especificidad dual de la proteína ORF2 regula la transcripción génica del huésped, la transducción de señales y las respuestas de citocinas durante la replicación viral. Recientemente, análisis de mutagénesis de dos residuos de aa básicos conservados antes del último residuo de histidina del motivo en VAP revelaron que los dos residuos afectan a la replicación viral, la citopatología *in vitro* y atenuación *in vivo* (Peters, M. A., Crabb, B. S., Washington, E. A. y Browning, G. F. (2006). Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of Chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *J Gen Virol* 87(Pt 4), 823-31; Peters, M. A., Crabb, B. S., Tivendale, K. A., y Browning, G. F. (2007). Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2. *J Gen Virol* 88(Pt 8), 2168-75). Los dos residuos de aa básicos ("K") están conservados en las tres cepas de PTTV2. Sin embargo, sólo el primer residuo básico ("R") se retiene en las dos cepas de PTTV1a, mientras que ambos residuos básicos se sustituyen en las cepas de PTTV1b (figura 5). En la figura 5, los guiones indican deleciones de aminoácidos. Los cinco aminoácidos conservados dentro del motivo común  $W_7H_xC_xC_xH$  (subrayado) identificado en TTV, TTMV y VAP están sombreados. Las posiciones de los dos residuos de aa básicos antes de la última histidina del motivo, que se ha demostrado que afectan a la replicación viral, la citopatología o la atenuación *in vivo* en VAP, se indican con "A".

En resumen, se divulgan en el presente documento las secuencias genómicas de longitud completa de cuatro cepas de TTV porcino que representan diferentes genotipos o subtipos en una muestra de suero de un único jabalí en Virginia. El hallazgo de este estudio indica claramente que, de manera similar a TTV humano, existen múltiples infecciones por PTTV con genotipos o subtipos distintos y probablemente son comunes en los cerdos. También se ha proporcionado nueva información sobre la organización genómica, el grado de variabilidad y las características de los motivos de aminoácido y los nucleótidos conservados de PTTV, lo que mejorará el análisis de detección mediante PCR actual, ayudará en el desarrollo de reactivos para el diagnóstico serológico y ayudará a iniciar el estudio estructural y funcional de PTTV. En el presente estudio también se propone una nueva clasificación de PTTV basada en los análisis filogenéticos y genéticos de las secuencias genómicas de siete cepas de PTTV conocidas.

- También se divulgan en el presente documento métodos para el diagnóstico de infección por TTV porcino mediante la detección de ADN viral en muestras de cerdos u otros mamíferos infectados por TTV porcino, incluyendo métodos para detectar secuencias de ácido nucleico de TTV porcino en una especie porcina u otra de mamífero usando cebadores oligonucleotídicos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ayudar adicionalmente en el diagnóstico de enfermedad o infección viral. Las pruebas de diagnóstico, que son útiles en la detección de la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico viral de TTV porcino en la especie porcina u otra de mamífero, comprenden aislar el ADN viral de muestras de cerdos infectados por TTV porcino o cerdos sospechosos de presentar infección de TTV, y realizar PCR cuantitativa en tiempo real con verde SYBR usando cebadores específicos de PTTV1 (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30) o específicos de PTTV2 (SEQ ID NO: 31/SEQ ID NO: 32).
- El método de diagnóstico puede adaptarse para detectar simultáneamente PTTV1 y PTTV2 mediante el uso de la PCR en tiempo real dúplex de PTTV1 PTTV2. Más específicamente, el método comprende aislar el ADN viral de muestras de cerdos infectados por TTV porcino o de cerdos sospechosos de presentar infección de TTV, realizando PCR en tiempo real usando cebadores tanto específicos de PTTV1 (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30) o específicos de PTTV2 (SEQ ID NO: 31/SEQ ID NO: 32) en la misma reacción de PCR en tiempo real. Puesto que el valor de  $T_f$  entre PTTV 1 y PTTV 2 puede distinguirse, puede detectarse simultáneamente la presencia de ADN de PTTV1 y PTTV2.
- El método de diagnóstico puede emplear PCR anidada dúplex. El método comprende aislar ADN viral de muestras de cerdos infectados por TTV porcino o de cerdos sospechosos de presentar infección de TTV, realizando una primera tanda de PCR usando una pareja de cebadores P1ab-mF (SEQ ID NO: 33)/P1ab-mR (SEQ ID NO: 34), y realizando una segunda tanda de PCR usando una mezcla de dos parejas de cebadores, P1a-nF (SEQ ID NO: 35)/P1a-nR (SEQ ID NO: 36) para la detección de PTTV1a, y P1b-nF (SEQ ID NO: 37)/P1b-nR (SEQ ID NO: 38) para la detección de PTTV1b y la visualización de los productos de PCR.
- Los métodos de diagnóstico anteriores pueden optimizarlos un experto en la técnica según métodos bien conocidos en la técnica.
- En consecuencia, se desarrollan dos nuevos ensayos de PCR en tiempo real con verde SYBR singleplex para cuantificar las cargas virales de dos especies de TTV porcino, respectivamente. Se diseñaron cebadores específicos de PTTV1 y PTTV2 para seleccionar como diana las regiones extremadamente conservadas en seis genomas de PTTV1 y cuatro genomas de PTTV2 de longitud completa disponibles hasta la fecha, respectivamente. Los dos ensayos singleplex pueden combinarse en un ensayo de PCR en tiempo real dúplex seguido de MCA de los amplicones virales que pueden identificarse por sus distintas temperaturas de fusión para la detección simultánea de las dos especies de TTV porcino, PTTV1a y PTTV1b. Se divulga un ensayo de PCR anidada dúplex para la amplificación simultánea de los ADN virales de dos tipos de PTTV1 en la primera tanda de PCR y se desarrolló la detección diferencial de los tipos la e lb en la segunda tanda de PCR para la identificación de dos tipos de especies de TTV porcino, PTTV1a y PTTV1b, en una única muestra. Estos ensayos representan herramientas simples y prácticas para el diagnóstico de TTV porcinos específicos de especie o tipo.
- Las posibles secuencias de cebadores se identificaron mediante alineaciones de secuencias múltiples de 10 genomas de TTV porcinos de longitud completa disponibles. Los cebadores específicos de PTTV1, TTV1F (SEQ ID NO: 29) y TTV1R (SEQ ID NO: 30) se diseñaron basándose en dos regiones genómicas conservadas inmediatamente antes del supuesto ORF2 en seis genomas de PTTV1, mientras que los cebadores específicos de PTTV2, TTV2F4 (SEQ ID NO: 31) y TTV2R4 (SEQ ID NO: 32) se diseñaron basándose en dos regiones genómicas conservadas inmediatamente después del supuesto ORF2/2 en cuatro genomas de PTTV2 (tabla 4). Los cebadores no mostraron potencial para la autodimerización y dimerización cruzada. Los tamaños de amplicón esperados fueron un fragmento de 118 pb de los cebadores de PTTV1 correspondientes al genoma de PTTV1b-VA y un fragmento de 200 pb de los cebadores de PTTV2 correspondientes al genoma de PTTV2c-VA, respectivamente.
- Tabla 4. Cebadores oligonucleotídicos usados para detecciones mediante PCR en tiempo real y PCR anidada dúplex de TTV porcinos.

ID del cebador	Secuencia (5' a 3')	Propósito
TTV1F SEQ ID NO:29	TCCGAATGGCTGAGTTTATGC	PCR en tiempo real específica de PTTV1
TTV1R SEQ ID NO:30	TCCGCTCAGCTGCTCCT	PCR en tiempo real específica de PTTV1
TTV2F4 SEQ ID NO:31	GGTGGTAAAGAGGATGAA	PCR en tiempo real específica de PTTV2
TTV2R4 SEQ ID NO:32	AATAGATTGGACACAGGAG	PCR en tiempo real específica de PTTV2
P1ab-mF SEQ ID NO:33	TATCGGGCAGGAGCAGCT	PCR anidada dúplex
P1ab-mR SEQ ID NO:34	TAGGGGGCGCGCTCTACGT	PCR anidada dúplex
P1a-nF SEQ ID NO:35	CCTACATGAAAGGAGAAAGACT	PCR anidada dúplex
P1a-nR SEQ ID NO:36	CCAGCGTCTCCAGGGTC	PCR anidada dúplex
P1b-nF SEQ ID NO:37	AAGCTACCAAGGGCTGG	PCR anidada dúplex
P1b-nR SEQ ID NO:38	GCGGTC(T/G)GTAGCGGTAGT	PCR anidada dúplex

5 La PCR en tiempo real simplex con verde SYBR usando cebadores específicos para PTTV1 y PTTV2 puede usarse específicamente para detectar D A de TTV1 y TTV2 porcinos, respectivamente. Para PTTV1, se estableció una curva patrón a lo largo de un intervalo de concentraciones de ADN objetivo por 25 µl. Se demostró que el intervalo lineal abarcaba de  $4,4 \times 10^1$  a  $4,4 \times 10^8$  copias. El límite de detección mínimo (44 copias) correspondió a un ciclo umbral ( $C_t$ ) de 37,57. Para PTTV2, también se generó una curva patrón y se usó para detectar la concentración de ADN que variaba de  $8,6 \times 10^0$  a  $8,6 \times 10^8$  copias por reacción de 25 µl. La  $C_t$  correspondiente del límite de detección mínimo (8,6 copias) fue de 36,53.

10 La PCR en tiempo real dúplex con verde SYBR se utiliza para la detección simultánea de ADN de TTV1 y TTV2 porcinos. La diferencia de 7 grados del valor de  $T_f$  entre PTTV1 (87,0°C) y PTTV2 (80,0°C) hizo posible distinguirlos entre sí mediante el MCA. Por tanto, pueden acoplarse dos ensayos singleplex en un ensayo de PCR en tiempo real dúplex para la detección simultánea de PTTV1 y PTTV2. Una muestra positiva fue aquella que tuvo un pico de fusión simétrico dentro de la  $T_f$  conocida para ese producto. Este nuevo ensayo se validó primero mediante el uso de una dilución de 10 veces de la mezcla de patrones de PTTV1 y PTTV2. El control negativo sin molde que usa agua estéril como molde mostró una amplificación inespecífica provocada por la dimerización cruzada entre los cebadores de PTTV1 y PTTV2 que no se observa en los ensayos singleplex (figura 7a). Esto produjo un pico de fusión distinto entre 72,0°C y 76,0°C. La figura 7A muestra los picos de fusión del patrón de PTTV1 (rojo;  $T_f = 87,0^\circ\text{C}$ ), patrón de PTTV2 (verde;  $T_f = 80,0^\circ\text{C}$ ) y control negativo sin molde (provocado por la dimerización cruzada del cebador; negro). Las figuras 7B-7E muestran picos de fusión de muestras de suero representativas con distintas cargas virales de PTTV1 y PTTV2. La figura 7B muestra la muestra de suero de jabalí n.º 5: cargas virales relativamente altas tanto de PTTV1 como de PTTV2, pero PTTV2 > PTTV1; la figura 7C muestra la muestra de suero de jabalí n.º 12: cargas virales relativamente altas tanto de PTTV1 como de PTTV2, pero PTTV1 > PTTV2; la figura 7D muestra la muestra de suero de jabalí n.º 14: bajas cargas virales tanto de PTTV1 como de PTTV2; la figura 7E muestra la muestra de suero de jabalí n.º 10: positiva para PTTV1, pero negativa para PTTV2. Las cargas virales (unidad: copias genómicas/ml) de PTTV1 y PTTV2 en cada muestra que se determinaron mediante PCR en tiempo real singleplex se indicaron en la parte superior del pico de fusión correspondiente.

30 En un ejemplo, cuando el ensayo en tiempo real dúplex se aplicó a las 20 muestras de suero de jabalíes adultos, las muestras con cargas virales relativamente altas tanto de PTTV1 como de PTTV2 presentaron dos curvas de fusión distintas correspondientes a PTTV1 y PTTV2 sin un pico de fusión inespecífico (figuras 7B y 7C), mientras que las muestras con baja carga viral o bien de PTTV1 o bien de PTTV2 mostraron curvas de fusión específicas de virus así como inespecíficas (figuras 7D y 7E). Aunque los dos picos de fusión en la muestra n.º 14 eran muy pequeños, se consideraron positivos, ya que presentaban un aumento y descenso visualmente distintos y simétricos en la  $T_f$  apropiada de PTTV1 y PTTV2 (figura 7D). En cambio, la muestra n.º 10 se consideró sólo positiva para PTTV1 porque evidentemente no estaba presente un pico de fusión de PTTV2 simétrico (figura 7E). Estos resultados concordaron con los de los dos ensayos singleplex (tabla 5). Además, el tamaño y la forma de los picos de fusión reflejan cualitativamente la carga viral correspondiente en la muestra detectada.

La PCR anidada dúplex se usa para la detección diferencial de dos tipos de TTV porcino, PTTV1 a y PTTV1b.

El inventor de la presente invención demostró la existencia de dos genotipos distintos, denominados tentativamente PTTV1a y PTTV1b, en la especie 1 de TTV porcino. Para determinar adicionalmente si la coinfección de PTTV1a y PTTV1b es común en cerdos, se desarrolló un nuevo ensayo de PCR anidada dúplex para distinguir rápidamente entre los dos. La alineación de las secuencias de ADN genómico de TTV porcino identificó una región genómica conservada ubicada en la parte N-terminal del supuesto ORF1 que codifica para la proteína de la cápside viral (figura 8). Esta región también contiene el ORF2 completo y la UTR parcial en el sentido de 5'. Los cebadores P1ab-mF (SEQ ID NO: 33)/P1ab-mR (SEQ ID NO: 34) se diseñaron para amplificar simultáneamente ambos ADN de PTTV1a y PTTV1b en la primera tanda de PCR. Se usó una mezcla de cebadores específicos de PTTV1a, P1a-nF (SEQ ID NO: 35)/P1a-nR (SEQ ID NO: 36) y cebadores específicos de PTTV1b, P1b-nF (SEQ ID NO: 37)/P1b-nR (SEQ ID NO: 38) para amplificar diferencialmente cada genotipo en la segunda tanda de PCR. Los productos de PCR finales de PTTV1a y PTTV1b tenían tamaños de 162 pb y 96 pb, respectivamente, que podían distinguirse fácilmente mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. No se esperaba que este ensayo detectara el ADN de PTTV2 debido a la especificidad de los cebadores (figura 8). En la figura 8, las secuencias conservadas se indicaron con puntos y sombreadas. Los guiones indicaron deleciones de nucleótidos. Las ubicaciones y direcciones de tres parejas de cebadores usados para la PCR anidada dúplex se marcaron con flechas.

En un ejemplo, se encontró que las 20 muestras de suero de jabalíes adultos que se sometieron al ensayo de PCR anidada dúplex fueron positivas tanto para PTTV1a como para PTTV1b, según se determinó visualizando dos bandas de los tamaños esperados y la posterior confirmación por secuenciación de los productos de PCR (datos no mostrados). No se amplificaron productos de PCR en las 19 muestras de semen, lo que concordó con los resultados de los ensayos convencionales de PTTV1 de PCR anidada y PCR en tiempo real descritos anteriormente.

La infección de cerdos con las dos especies de TTV porcino se ha encontrado desde 1985 en granjas porcinas españolas según una investigación retrospectiva (Segales *et al.*, 2009, citado anteriormente). Sin embargo, si los TTV porcinos están asociados con alguna enfermedad porcina en particular sigue siendo difícil de saber. Dado que ambas especies de TTV porcino tienen una alta prevalencia en cerdos domésticos, la determinación de las cargas virales de TTV es presumiblemente más importante que evaluar la presencia de ADN de TTV. El nivel de cargas virales en muestras de suero y semen se ha indicado como un marcador importante para EACVP en la infección por CVP2 (Opriessnig *et al.*, 2007, citado anteriormente) Por tanto, el establecimiento de ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real específicos de PTTV ayudaría a identificar posibles enfermedades asociadas con los TTV porcinos.

Recientemente se han descrito dos ensayos de PCR en tiempo real basados en sonda TaqMan. El ensayo singleplex desarrollado por un grupo canadiense no era específico de especie y sólo se diseñó para cuantificar las cargas virales totales de dos especies de PTTV (Brassard *et al.*, 2009, citado anteriormente). El ensayo dúplex establecido por un grupo alemán permitió la detección específica y simultánea de ambas especies (Gallei *et al.*, 2009, citado anteriormente). Las secuencias diana de los cebadores usados en esos dos ensayos se determinaron mediante la alineación de las tres secuencias genómicas de TTV porcino (Sd-TTV31, TTV-1 y TTV-2p) y se ubicaron en la UTR. En el presente estudio, con 7 secuencias genómicas de PTTV completas adicionales disponibles (4 secuencias de PTTV1 y 3 de PTTV2), se analizaron y volvieron a determinar las regiones conservadas en los 10 genomas de PTTV de longitud completa. Basándose en el resultado de alineación actualizado de este estudio, se desarrollaron dos ensayos de PCR en tiempo real basados en verde SYBR singleplex específicos de especie para cuantificar las cargas virales de PTTV1 y PTTV2, respectivamente. Los cebadores usados en los presentes ensayos se diseñaron para unirse a regiones genómicas conservadas distintas de los estudios anteriores, lo que puede aumentar la precisión de la cuantificación. Los presentes ensayos mostraron una considerable especificidad de especie y sensibilidad de detección con 44 copias genómicas para PTTV 1 y 8,8 copias genómicas para PTTV2 por reacción de 25 µl, mientras que se notificó el límite de detección de 10 copias genómicas por reacción en la PCR en tiempo real dúplex basada en sonda TaqMan (Gallei *et al.*, 2009, citado anteriormente). Además, el ensayo de PCR en tiempo real basado en verde SYBR es un enfoque flexible y económico que puede llevarse a cabo directamente sin la necesidad de usar sondas marcadas con fluorescencia. Finalmente, considerando que los TTV porcinos presentan un alto grado de diversidad genética, los resultados de los ensayos basados en verde SYBR probablemente no se vean afectados por los diferentes contextos genéticos de las variantes de TTV porcino que probablemente contienen mutaciones en las secuencias de unión a la sonda en los ensayos basados en sonda TaqMan.

A pesar de la presencia de ADN de TTV, todas las muestras de suero de cerdos sanos sometidas a prueba en este estudio tenían bajas cantidades de PTTV1 y PTTV2 que eran menores de  $2 \times 10^6$  copias/ml. Además, sólo se detectó un título extremadamente bajo de ADN de PTTV2 en tres muestras de semen. La mayoría de las muestras de suero sometidas a prueba también fueron positivas para el ADN de CVP2 según lo determinado mediante PCR anidada convencional (datos no mostrados). Muchos cerdos positivos para CVP2 con baja carga viral no desarrollan EACVP clínica. Un umbral propuesto para desarrollar EACVP es  $10^7$  o más copias genómicas de CVP2/ml de suero (Opriessnig *et al.*, 2007, citado anteriormente) Además, la positividad para el ADN de CVP2 en semen también es un marcador notable del estado de enfermedad (Opriessnig *et al.*, 2007, citado anteriormente; Pal, N., Huang, Y.W., Madson, D.M., Kuster, C., Meng, X.J., Halbur, P.G. y Opriessnig, T., 2008. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal

control on porcine semen samples. J Virol Methods 149, 217-25). La situación de PTTV específico de especie puede ser análoga a la de CVP2 y un alto título de PTTV mayor de  $10^7$  copias/ml puede requerirse para la inducción de enfermedades porcinas. Los ensayos de PCR en tiempo real específicos de especie desarrollados en este estudio ofrecerán herramientas simples y prácticas para futuras investigaciones de la asociación de PTTV con enfermedades usando una gran cantidad de muestras clínicas de diversos estados patológicos.

Además, al acoplar los dos ensayos singleplex específicos de especie, se desarrolló y validó un examen rápido, económico y fiable para la detección y diferenciación simultáneas de las dos especies de TTV porcino, PTTV1 y PTTV2, en un ensayo de PCR en tiempo real dúplex basado en MCA. Aunque este ensayo no está destinado a la cuantificación precisa de ambas especies de PTTV, es un enfoque más conveniente que podría reemplazar la PCR anidada convencional con propósitos de detección. En comparación con la PCR en tiempo real, el ensayo de PCR anidada convencional para la detección de TTV porcinos es lento (requiere un total de 4 tandas de PCR), laborioso y propenso a la contaminación de la muestra que se produce durante múltiples tandas de procesamiento de PCR. Debido a la diferencia del valor de  $T_f$  entre las especies PTTV1 y PTTV2, un MCA después de la amplificación mediante PCR dúplex puede garantizar una especificidad de reacción distinta. Otra ventaja de este ensayo en tiempo real dúplex es que la inclusión de los patrones de PTTV1 y PTTV2 es prescindible al realizar el protocolo descrito, lo que facilita el uso mucho más amplio en cualquier laboratorio de diagnóstico equipado con un instrumento de PCR en tiempo real automatizado.

Se ha demostrado la infección múltiple de los TTV porcinos con genotipos o subtipos distintos de la misma especie (Gallei *et al.*, 2009, citado anteriormente) En particular, el presente estudio anterior mostró que la especie 1 de TTV porcino consiste en dos tipos distintos, PTTV1a (incluidas las cepas Sd-TTV31 y PTTV1a-VA) y PTTV1 b (incluidas las cepas TTV-1p y PTTV1 b-VA). Los dos aislados de PTTV1 publicados recientemente con genomas de longitud completa, swSTHY-TT27 (GQ 120664) de Canadá y TTV1#471819 (GU188045) de Alemania, se clasificaron ambos en el tipo 1b según el análisis filogenético (datos no mostrados). La PCR anidada dúplex descrita en este estudio confirmó que la infección dual de dos genotipos de PTTV1 se producía con frecuencia en los cerdos. Este ensayo es el primer enfoque de diagnóstico mediante PCR desarrollado para distinguir entre PTTV1 a y 1b hasta ahora. Dado que actualmente no se sabe si una o ambas infecciones por PTTV1a y PTTV1b representan un factor relevante asociado con enfermedades, el presente ensayo de PCR diferencial debería ser de gran valor para futuras asociaciones potenciales de enfermedades de estos dos tipos de PTTV.

Las proteínas ORF de TTV porcino se expresaron y usaron en ensayos de inmunodetección para detectar la presencia de anticuerpos específicos de TTV porcino. Tres proteínas ORF1 truncadas y marcadas con histidina de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2, se expresaron y purificaron en *Escherichia coli* (*E. coli*), respectivamente. Además, tanto la inmunotransferencia de tipo Western de suero como los ensayos ELISA basados en estos antígenos recombinantes se desarrollaron y validaron usando muestras de suero porcino de diferentes fuentes. En particular, las pruebas serológicas usando el ELISA específico para PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 proporcionan una herramienta precisa y simple para revelar la asociación de la infección por TTV porcino con enfermedades.

Las proteínas ORF de TTV porcino se expresaron y purificaron como proteína de la cápside ORF1 recombinante en el sistema de expresión de *E. coli* (figura 10, figura 15). Tres proteínas de la cápside ORF1 marcadas con His y truncadas de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2, se expresaron y purificaron en *Escherichia coli* (*E. coli*), respectivamente, y sirvieron como vacunas de subunidades de la cápside recombinante contra la infección por PTTV.

Cuatro cepas de TTV2 porcino, TTV-2p, TTV2#472142, PTTV2b-VA y PTTV2c-VA, tenían secuencias genómicas completas disponibles hasta la fecha. Aunque se clasifican filogenéticamente en tres supuestos subtipos, un análisis comparativo de los perfiles de hidrofiliidad de los aminoácidos que codifican para ORF1 de cuatro PTTV2 mostró que compartían tres regiones hidrófilas, una región rica en arginina desde los aa 1-49 en el extremo N-terminal y dos dominios particulares (I y II) ubicados en la parte central y C-terminal, respectivamente (figura 9A). La región C-terminal usada para la expresión de ORF1 de PTTV2c-VA truncado y las regiones correspondientes compartidas en otras tres cepas de PTTV2 se indicaron mediante un recuadro discontinuo. Las alineaciones de secuencias de aminoácidos demostraron altos niveles de conservación de la secuencia de los dominios I (aa 322-349) y II (aa 536-625) a través de las cuatro cepas de PTTV2 (figura 9B).

Dado que se cree que los dominios hidrófilos son importantes para la antigenicidad de muchas proteínas, la región C-terminal (aa 310-625) del ORF1 de PTTV2c-VA, SEQ ID NO: 16 que contiene los dos dominios se eligió para la expresión de proteínas, que se usaría como antígeno para la detección de anticuerpos específicos de PTTV2 en suero porcino. La expresión del ORF1 de PTTV2c truncado fue suficiente para la detección de todos los subtipos de PTTV2 (2a, 2b y 2c; véase también la figura 3A).

La parte C-terminal del gen de ORF1 de PTTV2c fusionado con 8 x colas de His se construyó y expresó en *E. coli*. La proteína recombinante era insoluble y se expresaba dentro de los cuerpos de inclusión bacterianos. La figura 10A muestra SDS-PAGE de productos de 2c-ORF1 no purificados. La figura 10B muestra SDS-PAGE de productos de 2c-ORF1 purificados. La figura 10C muestra el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de productos de 2c-ORF1 purificados usando un Acm anti-cola de His. Las puntas de flecha de color blanco indicaron la proteína ORF1 con el tamaño esperado y su producto truncado, mientras que las puntas de flecha de color negro muestran los supuestos dímeros de las proteínas esperadas y truncadas. M: marcadores proteicos. En la figura 10A, se

produjeron dos polipéptidos significativos (puntas de flecha de color blanco) en la muestra sin purificar de 2c-ORF1 en comparación con la muestra de control. La banda de ~40 KDa concordó con el tamaño esperado de 2c-ORF1, mientras que el polipéptido de ~30 KDa fue probablemente un producto truncado N-terminal del primero. Después de la purificación con una columna de afinidad de níquel, se mostraron cuatro polipéptidos que incluían las dos bandas significativas descritas en SDS-PAGE (figura 10B). También se detectaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un Acm anti-cola de His (figura 10C). Dos bandas de alto peso molecular (puntas de flecha de color negro) fueron los homodímeros formados por los dos polipéptidos de ~40 KDa y ~30 KDa, respectivamente, basados en los tamaños predichos (~80 KDa y ~60 KDa). Los resultados demostraron que el PTTV2c-ORF1 C-terminal purificado se produjo con éxito y podría usarse para la detección de anticuerpos contra TTV2 porcino en sueros porcinos.

Los anticuerpos contra TTV2 porcino en diversas muestras de suero porcino pueden detectarse mediante inmunotransferencia de tipo Western usando PTTV2c-ORF1 C-terminal purificado. Las puntas de flecha de color blanco indicaron la proteína ORF1 con el tamaño esperado y su producto truncado. Cabe señalar que sólo las bandas de color verde se reconocieron como positivas. Se recogió un total de más de 200 muestras de suero de cerdos convencionales (sanos o enfermos), cerdos CD/CD y cerdos gnotobióticos de diferentes fuentes. Las muestras se seleccionaron aleatoriamente para la detección de anticuerpos IgG anti-PTTV2c-ORF1 usando el PTTV2c-ORF1 C-terminal purificado como antígeno. La figura 11A muestra los resultados de los análisis de inmunotransferencia de tipo Western de muestras de suero porcino seleccionadas de cerdos convencionales, la figura 11B muestra cerdos CD/CD, y la figura 11C muestra cerdos gnotobióticos. Los productos de PTTV2c-ORF1 purificados se usaron como antígenos. Las dos bandas marcadas de ~40 KDa y ~30 KDa se detectaron en la mayoría de las muestras de cerdos convencionales (figura 11A) y cerdos CD/CD (figura 11B), lo que indica ampliamente una infección por PTTV2 en estos cerdos. Sin embargo, todos los cerdos gnotobióticos de dos fuentes diferentes (Blacksburg, VA y Ames, IA) no tenían anticuerpos contra PTTV2 detectables (figura 11C). También se observaron bandas adicionales de bajo peso molecular (figuras 11A y 11B). Probablemente eran de reactividad inespecífica en la inmunotransferencia de tipo Western.

El ELISA específico de PTTV2 puede usarse como prueba serológica de TTV2 porcino. Los resultados seronegativos también se mostraron en algunas muestras de cerdos convencionales de una granja de Wisconsin (figura 12). Estas muestras negativas se reunieron y se usaron como referencia negativa en el desarrollo de un ELISA específico para PTTV2. Las muestras restantes de esta fuente fueron positivas (figura 12, los cuatro carriles de la izquierda). Además, los sueros porcinos de una empresa comercial usada en cultivo celular (supuestamente libre de enfermedades de la OIE) también mostraron una fuerte positividad anti-PTTV2-ORF2 (figura 12), que se usó como control positivo para ELISA. Las concentraciones del antígeno 2c-ORF1 purificado, los sueros porcinos y el conjugado de IgG se determinaron mediante titulación en formato de tablero de ajedrez para presentar una baja señal de fondo y proporcionar la mayor diferencia de valor de  $DO_{405}$  entre los controles positivos y negativos. La cantidad óptima de antígeno fue de 69 ng por pocillo, y los resultados óptimos de ELISA se obtuvieron mediante el uso de una dilución 1:100 de muestras de suero y una dilución 1:4000 de conjugados de IgG. Los valores de punto de corte de ELISA oscilaron desde 0,25 hasta 0,5 en cada ensayo. La figura 4 muestra un resultado representativo que refleja la sistematicidad de la inmunotransferencia de tipo Western de suero y el ELISA desarrollado.

Se eligieron 138 muestras de suero de cerdos convencionales de 3 piaras para analizar la correlación entre la carga viral de PTTV2 mediante PCR en tiempo real y el nivel de anticuerpos IgG anti-PTTV2 mediante ELISA. Los resultados mostraron que los cerdos con una carga viral de PTTV2 indetectable o mayor (10 copias/ml) tenían más probabilidades de tener un título de anticuerpos de PTTV2 sérico menor que los cerdos con valores medios de carga viral de PTTV2 (figura 13).

En particular, los sueros de 10 cerdos en la misma piara también se analizaron comparando las cargas virales PTTV2 y los niveles de anticuerpos anti-PTTV2 de sus sueros desde su llegada a la nueva instalación hasta dos meses después de la llegada. Nueve de los 10 cerdos tenían cargas virales disminuidas (tres no tenían virus detectable) después de 2 meses, mientras que los títulos de anticuerpos anti-PTTV2 aumentaron en nueve de los 10 cerdos (figuras 14A y 14B). Los resultados sugirieron que los 10 cerdos adquirieron la infección por PTTV2 en la fase temprana, lo que indujo una respuesta humoral y produjo progresivamente el anticuerpo IgG anti-cápsula ORF1. El anticuerpo IgG contra PTTV2-ORF1 fue capaz de neutralizar o eliminar incluso el virus, lo que indica que el ORF1 codifica efectivamente para una proteína de la cápside viral y puede contener epítomos neutralizantes contra PTTV2.

Las proteínas PTTV1a- y PTTV1b-ORF1 C-terminales se expresaron y purificaron en el sistema de *E. coli*, respectivamente. La SDS-PAGE y el análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un Acm anti-cola de His mostraron que ambos productos de 1a y 1b-ORF tenían dos polipéptidos, uno con el tamaño esperado (~40 KDa) y otro como el supuesto homodímero (~80 KDa) (figuras 15A-C). La figura 15A muestra SDS-PAGE de productos de 1a-ORF1 purificados y no purificados. La figura 15B muestra SDS-PAGE de productos de 1b-ORF1 truncado y 1b-ORF1 purificado. La figura 15C muestra el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de productos purificados de 1a y 1b-ORF1 usando un Acm anti-cola de His. Las puntas de flecha de color blanco indican la proteína ORF1 con el tamaño esperado, mientras que las puntas de flecha de color negro muestran el supuesto dímero de las proteínas ORF1. En comparación con la expresión de 2c-ORF1, no se observó polipéptido truncado. Como control comparativo, la expresión de una región 1b-ORF1 truncada en la parte C-terminal (1b-ORF1 trunc) dio

como resultado un polipéptido de menor peso molecular en comparación con su homólogo no truncado C-terminal 1b-ORF1 (figura 15B).

Las proteínas purificadas de PTTVa y PTTV 1b-ORF1 C-terminales se usaron para desarrollar ELISA e inmunotransferencias de tipo Western de suero específicas de genotipo tal como se describió anteriormente para PTTV2. La figura 16 muestra ejemplos negativos (carriles 1-2) y positivos (carriles 3-5) de inmunotransferencia de tipo Western de suero usando 1a-ORF1 como antígeno. Se usaron la misma cantidad de antígeno (69 ng), dilución de sueros (1:100) y dilución de conjugado de IgG (1:4000) que PTTV2-ORF1 en ELISA específico de PTTV1a y PTTV1b (datos no mostrados).

Adicionalmente, se divulga un reactivo de diagnóstico útil para detectar la infección por TTV porcino que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal purificado de un huésped natural tal como, por ejemplo, inoculando un cerdo con el TTV porcino o la composición inmunogénica de la invención en una cantidad inmunogénica eficaz para producir una infección viral y recuperar el anticuerpo del suero del cerdo infectado. Alternativamente, los anticuerpos pueden generarse en animales de experimentación contra los polipéptidos naturales o sintéticos derivados o expresados a partir de las secuencias de aminoácidos o fragmentos inmunogénicos codificados por la secuencia de nucleótidos del TTV porcino aislado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse a partir de células de hibridoma que se obtienen de ratones tales como, por ejemplo, Balb/c, inmunizados con un antígeno polipeptídico derivado de la secuencia de nucleótidos del TTV porcino aislado. La selección de las células de hibridoma se realiza mediante el crecimiento en hipoxantina, timidina y aminopterina en un medio de cultivo celular convencional como el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo. Las células de hibridoma que producen anticuerpos pueden clonarse según procedimientos conocidos en la técnica. Luego, las colonias discretas que se forman pueden transferirse a pocillos independientes de placas de cultivo para el cultivo en un medio de cultivo adecuado. La identificación de las células secretoras de anticuerpos se realiza mediante métodos de detección convencionales con el antígeno o inmunógeno apropiado. El cultivo de las células de hibridoma *in vitro* o *in vivo* obteniendo líquido ascítico en ratones después de inyectar el hibridoma produce el anticuerpo monoclonal deseado mediante técnicas bien conocidas.

Para otro método alternativo, la proteína de la cápside de TTV porcino puede expresarse en un sistema de expresión de baculovirus o sistema de expresión de *E. coli* según procedimientos conocidos en la técnica. La proteína de la cápside de TTV porcino recombinante expresada puede usarse como antígeno para el diagnóstico en un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). El ensayo ELISA basado en el antígeno de la cápside recombinante porcina, por ejemplo, puede usarse para detectar anticuerpos contra TTV porcino en especies porcinas y de mamíferos. Aunque se prefiere el ensayo ELISA, pueden emplearse otras pruebas de diagnóstico conocidas, tales como ensayo de inmunofluorescencia (IFA), ensayo de inmunoperoxidasa (IPA), etc.

De manera deseable, se divulga un ensayo de diagnóstico de ELISA comercial que se usa para diagnosticar la infección por TTV porcino en cerdos. Los ejemplos ilustran el uso de proteínas ORF1 y ORF2 purificadas de TTV porcino para desarrollar un ensayo ELISA para detectar anticuerpos anti-TTV en cerdos. Los sueros recogidos de cerdos infectados por TTV porcino y los sueros negativos de cerdos de control se usan para validar el ensayo. Se demostró que los anticuerpos específicos de PTTV2, específicos de PTTV1a y específicos de PTTV1b reconocen específicamente las proteínas ORF de PTTV. La normalización adicional de la prueba mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica puede optimizar la comercialización de un ensayo de diagnóstico para TTV porcino.

En el presente documento también se divulga una composición inmunogénica única que comprende el TTV porcino aislado o una proteína antigénica codificada por un polinucleótido aislado descrito anteriormente en el presente documento y su uso para generar o producir anticuerpos. La composición contiene un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes. Los vehículos adecuados tales como, por ejemplo, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc., se seleccionan fácilmente de los excipientes convencionales y pueden añadirse agentes de coformulación. Pueden realizarse pruebas de rutina para garantizar la compatibilidad física y la estabilidad de la composición final.

Según la presente divulgación, se proporcionan además moléculas infecciosas de ácidos nucleicos y moleculares de torque teno virus (TTV) porcinos vivos producidos a partir de la molécula de ácido nucleico y vacunas veterinarias para proteger a los cerdos frente a la enfermedad o infección viral por TTV porcino provocada por la coinfección por TTV porcino con otros virus. La divulgación proporciona además productos de expresión de polipéptidos inmunogénicos que pueden usarse como vacunas.

La nueva molécula de ADN infecciosa de TTV porcino comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para al menos una parte de un genoma infeccioso de PTTV1a-VA (SEQ ID NO: 9), PTTV1 b-VA (SEQ ID NO: 10), PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 11), o PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 12). El clon de ADN de PTTV infeccioso contiene preferiblemente al menos uno de los genes de ORF1, ORF2, ORF1/1 y ORF2/2 del PTTV1 o PTTV2. Varias copias del genoma de PTTV1a-VA (SEQ ID NO: 9), PTTV1b-VA (SEQ ID NO: 10), PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 11) o PTTV2c-VA (SEQ ID NO: 12) pueden insertarse en una única molécula de ADN para construir clones de PTTV infecciosos en tándem.

El ADN genómico clonado de PTTV, particularmente PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2c-VA, y PTTV2b-RR, PTTV2c-

RR en tándem, descritos en el presente documento, se muestra que es infeccioso *in vitro* o *in vivo* cuando se transfecta en células PK-15 y se administra a los cerdos. Este nuevo agente patógeno fácilmente reproducible se presta al desarrollo de un programa de vacunación adecuado para prevenir la infección por PTTV en cerdos.

5 Según una divulgación adicional, tres clones de ADN de PTTV de una copia del genoma derivaron de los aislados prototipo estadounidenses PTTV1a-VA, PTTV1b-VA y PTTV2c-VA mediante PCR de fusión, respectivamente. Cada uno de los ADN genómicos de longitud completa se insertó en un vector de clonación pSC-B-amp/kan mediante ligamiento de extremos romos. El sitio de restricción BamH I es el sitio único en los tres genomas de PTTV, que se modificó por ingeniería en ambos extremos de los tres genomas para facilitar la generación de concatémicos y así imitar el genoma circular de TTV. Las digestiones individuales de BamH I del ADN de plásmido seleccionado de cada clon claramente dieron como resultado dos fragmentos diferentes de 4,3 Kb y 2,8 Kb de tamaño (figura 18A). Los fragmentos de 4,3 Kb representaban el vector de estructura principal, mientras que los fragmentos de 2,8 Kb representaban el ADN genómico de PTTV insertado. El vector vacío pSC-B-amp kan digerido con la misma enzima sólo mostró una banda de 4,3 Kb (figura 18A). Los clones de PTTV resultantes se designaron como pSC-PTTV1a, pSC-PTTV1b y pSC-PTTV2c, respectivamente (figuras 17A-C).

15 Además, dos copias del genoma completo de PTTV2c-VA derivado del clon pSC-PTTV2c se ligaron en tándem en el vector pSC-B-amp/kan para generar el clon pSC-2PTTV2c-RR (figura 17D). La comparación de los patrones de digestiones individuales de Afl II entre pSC-PTTV2c y pSC-2PTTV2c-RR mostró que el último plásmido tenía un fragmento de 2,8 Kb adicional que representa la segunda copia del genoma de PTTV2c (figura 18B, panel derecho). Posteriormente, se usó la misma estrategia de clonación para producir un clon de ADN de PTTV2b dimerizado en tándem derivado del clon de TTV de Alemania TTV2-#471942-full. Se presentó un fragmento de 2,8 Kb adicional que representa la segunda copia del genoma de PTTV2b en este constructo, designado como pSC-2PTTV2b-RR (figura 17F), que se digirió con el Hind III solo en comparación con su homólogo de una copia del genoma (figura 18B, panel izquierdo), confirmando la construcción exitosa.

25 Las competencias de replicación de los clones infecciosos de PTTV construidos se sometieron a prueba mediante transfección *in vitro* de células PK-15. El uso de IFA con los anticuerpos policlonales de conejo generados comercialmente contra ORF1 de PTTV2c confirmó que tanto los concatémicos de los clones TTV2-#471942-full como pSC-PTTV2c eran competentes en la replicación, respectivamente (figura 19A y figura 20A). Los pases de las células transfectadas no eliminaron ni redujeron las señales fluorescentes (figura 19B y figura 20B), lo que sugiere que la expresión de las proteínas ORF1 fue el resultado de los concatémicos de PTTV2 que imitaban las moléculas circulares de PTTV2b o PTTV2c naturales. No se observaron señales fluorescentes en células transfectadas de manera simulada o células transfectadas con ADN usando suero de conejo preinmunitario como anticuerpo para la detección mediante IFA (datos no mostrados). Los concatémicos del clon pSC-PTTV1a también demostraron ser competentes en la replicación usando un anticuerpo anti-ORF1 de PTTV1a (figura 21). Las señales fluorescentes positivas se ubicaron en el núcleo de las células transfectadas o sometidas a pases, lo que indica que los TTV porcinos probablemente se replican en el núcleo celular. No es inesperado porque el circovirus porcino (CVP) tiene un patrón de expresión similar *in vitro*.

35 La transfección directa del clon dimerizado en tándem pSC-2PTTV2b-RR o pSC-2PTTV2c-RR en células PK-15 da como resultado la replicación viral y produce el antígeno de la cápsida ORF1. IFA usando anticuerpos contra ORF1 de PTTV2 confirmó que ambos clones también eran competentes en la replicación y que los antígenos de ORF1 positivos estaban localizados en los núcleos (figuras 22A y B).

Según la divulgación, los clones infecciosos de TTV porcino pueden usarse para inocular cerdos, lo que provocará una respuesta inmunitaria del animal huésped y estimulará la producción de anticuerpos neutralizantes. Los dos clones de PTTV2 dimerizados en tándem fueron infecciosos cuando se inyectaron en los ganglios linfáticos y los músculos de cerdos convencionales.

45 Para someter a prueba la infectividad *in vivo* de clones moleculares de PTTV2, se inocularon cerdos convencionales con el clon pSC-2TTV2b-RR o pSC-2TTV2c-RR. Se recogieron muestras de suero de animales a los 0, 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (DPI, *days post-inoculation*). Se detectó ADN de PTTV2 en cerdos inoculados con pSC-2TTV2c-RR a partir del 7 DPI (n.º 92), 14 DPI (n.º 188 y n.º 191) y 21 DPI (n.º 180), respectivamente (figura 23A, panel derecho). La viremia de PTTV apareció de manera tardía para los cerdos inoculados con el clon pSC-2TTV2b-RR: dos comenzaron en el 14 DPI (n.º 189 y n.º 192), uno en el 21 DPI (n.º 181) y uno en el 28 DPI (n.º 193) (figura 23 A, panel izquierdo). Las cargas virales aumentaron durante el transcurso en todos los cerdos inoculados que tenían las cargas virales más altas en el 28 DPI antes de la necropsia, según lo determinado mediante PCR en tiempo real específica de PTTV2 (figura 23A). Los productos de PCR en tiempo real amplificados de cerdos seleccionados se secuenciaron y se encontró que tenían secuencias idénticas a las regiones correspondientes de pSC-2TTV2b-RR o pSC-2TTV2c-RR (datos no mostrados).

55 Todos los cerdos inoculados fueron negativos para anticuerpos contra ORF1 de PTTV2 en 0 y 7 DPI. En el 14 DPI, los cuatro cerdos inoculados con pSC-2TTV2b-RR se seroconvirtieron a IgG anti-ORF1 de PTTV2, mientras que los cerdos en el grupo inoculado con pSC-2TTV2c-RR se seroconvirtieron en el 14 (n.º 92 y n.º 180), 21 (n.º 191) y 28 (n.º 188) DPI, respectivamente (figura 23B). Los resultados indicaron que se había producido una infección activa por TTV2b o TTV2c porcino.

60

También se divulgan en el presente documento vacunas de los clones de ADN molecular infeccioso y viral infeccioso, y los métodos para usarlos. Los cerdos inoculados están protegidos frente a la infección viral y las enfermedades asociadas provocadas por la infección o coinfección por TTV2. El nuevo método protege a los cerdos que necesitan protección frente a la infección viral administrando al cerdo una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna según la divulgación tal como, por ejemplo, una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica del ADN de PTTV infeccioso, un plásmido o vector viral que contiene el clon de ADN infeccioso de PTTV, el ADN de PTTV recombinante, los productos de expresión de polipéptidos, la proteína de la cápside ORF1 recombinante purificada expresada en bacterias o en baculovirus, etc. Otros antígenos tales como VSRRP, PVP, otros agentes porcinos infecciosos y estimulantes inmunitarios pueden administrarse simultáneamente al cerdo para proporcionar un amplio espectro de protección frente a las infecciones virales.

Las vacunas comprenden, por ejemplo, los clones de ADN viral y molecular infeccioso, el genoma de ADN infeccioso de PTTV clonado en plásmidos o vectores adecuados tales como, por ejemplo, el vector pSC-B, un virus vivo avirulento, un virus inactivado, vacuna de subunidades de cápside recombinante expresada, etc. en combinación con un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes. La vacuna también puede comprender el clon de ADN molecular de TTV2 infeccioso descrito en el presente documento. Se prefieren el ADN de PTTV infeccioso, el ADN de plásmido que contiene el genoma viral infeccioso y el virus vivo, siendo el virus vivo el más preferido. La vacuna viral avirulenta y viva de la divulgación proporciona una ventaja con respecto a las vacunas virales tradicionales que usan virus vivos atenuados que corren el riesgo de revertir de vuelta al estado virulento o del virus completo propagado por cultivo celular inactivado que puede no inducir una respuesta inmunitaria de anticuerpos suficiente para la protección frente a la enfermedad viral.

También se divulgan vacunas y métodos para usarlos. Las especies de mamíferos inoculadas están protegidas frente a una infección viral grave, también pueden brindar protección para enfermedades relacionadas con la coinfección de PTTV, tales como síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (SDNP), el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (SDMP) y otras enfermedades relacionadas. Las vacunas comprenden, por ejemplo, un virus TTV porcino inactivado o atenuado, un vehículo no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes.

El adyuvante, que puede administrarse junto con la vacuna de la presente invención, es una sustancia que aumenta la respuesta inmunológica del cerdo a la vacuna. El adyuvante puede administrarse al mismo tiempo y en el mismo sitio que la vacuna, o en un momento diferente, por ejemplo, como refuerzo. Los adyuvantes también pueden administrarse ventajosamente al cerdo de una manera o en un sitio diferente de la manera o el sitio en el que se administra la vacuna. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio (alumbre), complejos inmunoestimulantes (ISCO S), polímeros o copolímeros de bloque no iónicos, citocinas (como IL-1, IL-2, 1L-7, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , etc.), saponinas, monofosforil-lípido A (MLA), dipéptidos de muramilo (MDP) y similares. Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio y potasio, enterotoxina termolábil o termoestable aislada de *Escherichia coli*, toxina del cólera o la subunidad B de la misma, toxina diftérica, toxina tetánica, toxina de la tos ferina, adyuvante completo o incompleto de Freund, etc. Los adyuvantes basados en toxinas, tales como la toxina diftérica, la toxina tetánica y la toxina de la tos ferina pueden inactivarse antes del uso, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído.

Las vacunas pueden contener además antígenos adicionales para fomentar la actividad inmunológica de los clones de ADN de PTTV infeccioso tales como, por ejemplo, el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP), parvovirus porcino (PVP), otros agentes porcinos infecciosos y estimulantes inmunitarios.

Las nuevas vacunas de esta invención no están restringidas a ningún tipo o método particular de preparación. Las vacunas virales clonadas incluyen, entre otras, vacunas de ADN infeccioso (es decir, el uso de plásmidos, vectores u otros portadores convencionales para inyectar ADN directamente en cerdos), vacunas vivas, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas de subunidades, vacunas atenuadas, vacunas modificadas genéticamente, etc. Estas vacunas se preparan mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.

Como beneficio adicional, el virus vivo preferido de la presente invención proporciona una vacuna genéticamente estable que es más fácil de fabricar, almacenar y administrar que otros tipos de vacunas atenuadas.

Otra vacuna preferida divulgada en el presente documento usa plásmidos adecuados para administrar el clon de ADN no patógeno a cerdos. A diferencia de la vacuna tradicional que usa virus completos propagados por cultivo celular vivos o inactivados, esto proporciona la inoculación directa de cerdos con el ADN de plásmido que contiene el genoma viral infeccioso.

Las vacunas modificadas genéticamente adicionales, que son deseables en la presente invención, se producen mediante técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas implican, pero no se limitan a, la manipulación adicional de ADN recombinante, modificación o sustituciones de las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes y similares.

Las vacunas modificadas genéticamente basadas en tecnología de ADN recombinante se producen, por ejemplo, mediante la identificación de partes alternativas del gen viral que codifican para las proteínas responsables de

inducir una respuesta inmunitaria o protectora más fuerte en los cerdos (por ejemplo, proteínas derivadas de ORF1, ORF1/1, ORF2, ORF2/2, etc.). Tales genes identificados o fragmentos inmunodominantes pueden clonarse en vectores de expresión de proteínas convencionales, tales como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, O'Reilly *et al.*, "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual", Freeman & Co., 1992). Las células huésped se cultivan, expresando así las proteínas de vacuna deseadas, que pueden purificarse en el grado deseado y formularse en un producto de vacuna adecuado. Las vacunas de subunidades recombinantes se basan en proteínas de la cápside ORF1 expresadas en bacterias (figura 10, figura 15) o expresadas en baculovirus de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2.

Si los clones retienen cualquier capacidad natural no deseable de provocar enfermedad, también es posible identificar las secuencias de nucleótidos en el genoma viral responsables de cualquier virulencia residual, y modificar genéticamente el virus avirulento mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis dirigida al sitio puede añadir, delecionar o cambiar uno o más nucleótidos (véase, por ejemplo, Zoller *et al.*, DNA 3: 479-488, 1984). Se sintetiza un oligonucleótido que contiene la mutación deseada y se hibrida a una parte de ADN viral monocatenario. La molécula híbrida, que resulta de ese procedimiento, se emplea para transformar bacterias. Luego, el ADN bicatenario, que se aísla con la mutación apropiada, se usa para producir ADN de longitud completa mediante ligamiento a un fragmento de restricción de este último que posteriormente se transfecta en un cultivo celular adecuado. El ligamiento del genoma en el vector adecuado para la transferencia puede realizarse a través de cualquier técnica convencional conocida por los expertos en la técnica. La transfección del vector en células huésped para la producción de progenie viral puede realizarse usando cualquiera de los métodos convencionales tales como transfección mediada por fosfato de calcio o DEAE-dextrano, electroporación, fusión de protoplastos y otras técnicas bien conocidas (por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El virus clonado presenta entonces la mutación deseada. Alternativamente, pueden sintetizarse dos oligonucleótidos que contienen la mutación apropiada. Estos pueden hibridarse para formar ADN bicatenario que puede insertarse en el ADN viral para producir ADN de longitud completa.

Una cantidad inmunológicamente eficaz de las vacunas de la presente invención se administra a un cerdo que necesita protección frente a la infección viral. La cantidad inmunológicamente eficaz o la cantidad inmunogénica con que se inocula al cerdo puede determinarse fácilmente o titularse fácilmente mediante pruebas de rutina. Una cantidad eficaz es aquella en la que se alcanza una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna para proteger al cerdo expuesto al virus PTTV. Preferiblemente, el cerdo está protegido en un grado en el que uno a todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de la enfermedad viral se reducen significativamente, mejoran o previenen totalmente.

La vacuna puede administrarse en una dosis única o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden oscilar, por ejemplo, desde aproximadamente 1 microgramo hasta aproximadamente 1.000 microgramos del ADN de plásmido que contiene el genoma de ADN quimérico infeccioso (dependiendo de la concentración del componente inmunoactivo de la vacuna), preferiblemente de 100 a 200 microgramos del clon de ADN de TTV porcino, pero no debe contener una cantidad de antígeno basado en virus suficiente como para provocar una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección viral. Se conocen métodos en la técnica para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo para hallar dosis eficaces mínimas basándose en el peso del cerdo, la concentración del antígeno y otros factores típicos. Preferiblemente, el clon de ADN viral infeccioso se usa como vacuna, o puede generarse un virus infeccioso vivo *in vitro* y luego el virus vivo se usa como vacuna. En ese caso, puede administrarse a un cerdo desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 10.000 de la dosis infecciosa en cultivo tisular al 50% (TCID 50) de virus vivos, por ejemplo.

Las vacunas de esta divulgación no están restringidas a ningún tipo o método particular de preparación. Las vacunas incluyen, entre otras, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas de subunidades, vacunas atenuadas, vacunas modificadas genéticamente, etc.

Las ventajas de las vacunas vivas son que todas las respuestas inmunitarias posibles se activan en el receptor de la vacuna, incluyendo respuestas inmunitarias sistémicas, locales, humorales y mediadas por células. Las desventajas de las vacunas de virus vivos, que pueden ser mayores que las ventajas, radican en el potencial de contaminación con agentes virales adventicios vivos o el riesgo de que el virus pueda revertir a virulencia en el campo.

Para preparar vacunas de virus inactivados, por ejemplo, la propagación viral y la producción viral pueden tener lugar en líneas celulares porcinas en cultivo tales como, sin limitación, células PK-15. La inactivación viral en serie se optimiza luego mediante protocolos conocidos generalmente por los expertos en la técnica o, preferiblemente, mediante los métodos descritos en el presente documento.

Las vacunas de virus inactivados pueden prepararse tratando el TTV porcino con agentes de inactivación tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, etc., mediante irradiación con luz ultravioleta o rayos X, mediante calentamiento, etc. La inactivación se realiza de una manera conocida en la técnica. Por ejemplo, en la inactivación química, una muestra de virus o muestra de scum adecuada que contiene el virus se trata durante un periodo de tiempo suficiente con una cantidad o concentración suficiente de agente de inactivación a una temperatura o un pH suficientemente alto (o bajo, dependiendo del agente de inactivación) para inactivar el virus. La inactivación mediante calentamiento se lleva a cabo a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficientes como para

inactivar el virus. La inactivación mediante irradiación se lleva a cabo usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante un periodo de tiempo suficiente como para inactivar el virus. El virus se considera inactivado si no es capaz de infectar una célula susceptible a la infección.

5 La preparación de vacunas de subunidades difiere normalmente de la preparación de una vacuna viva modificada o una vacuna inactivada. Antes de la preparación de una vacuna de subunidades, deben identificarse los componentes protectores o antigénicos de la vacuna. En la presente divulgación, los componentes antigénicos de PTTV se identificaron como las proteínas de la cápside ORF1 de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2, que se expresaron y purificaron en *Escherichia coli* (*E. coli*) y otro sistema de expresión, tal como el sistema de expresión de baculovirus, para su uso como vacunas de cápsides recombinantes de subunidades. Tales componentes protectores o antigénicos incluyen ciertos segmentos de aminoácidos o fragmentos de las proteínas de la cápside viral que generan una respuesta protectora o inmunológica particularmente fuerte en los cerdos; las propias proteínas de la cápside virales simples o múltiples, oligómeros de las mismas, y asociaciones de orden superior de las proteínas de la cápside viral que forman subestructuras virales o partes o unidades identificables de tales subestructuras: oligoglicósidos, glicolípidos o glicoproteínas presentes en o cerca de la superficie del virus o en subestructuras virales tales como las lipoproteínas o los grupos lipídicos asociados con el virus, etc. Preferiblemente, la proteína ORF1 se emplea como el componente antigénico de la vacuna de subunidades. También pueden usarse otras proteínas, tales como las codificadas por la secuencia de nucleótidos en los genes de ORF2, ORF1/1 y ORF2/2. Estos componentes inmunogénicos se identifican fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica. Una vez identificadas, las partes protectoras o antigénicas del virus (es decir, la "subunidad") se purifican y/o clonan posteriormente mediante procedimientos conocidos en la técnica. La vacuna de subunidades proporciona una ventaja con respecto a otras vacunas basadas en el virus vivo ya que la subunidad, tal como las subunidades altamente purificadas del virus, es menos tóxica que el virus completo.

25 Si la vacuna de subunidades se produce mediante técnicas genéticas recombinantes, la expresión de la subunidad clonada, tales como los genes de ORF1, ORF2, ORF1/1 y ORF2/2, por ejemplo, puede expresarse mediante el método proporcionado anteriormente, y también puede optimizarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Mass. (1989)). Por otro lado, si la subunidad que está empleándose representa una característica estructural intacta del virus, tal como una proteína de la cápside completa, entonces debe optimizarse el procedimiento para su aislamiento del virus. En cualquier caso, después de la optimización del protocolo de inactivación, el protocolo de purificación de subunidades puede optimizarse antes de la fabricación.

35 Para preparar vacunas atenuadas, el virus patógeno vivo se atenúa primero (se vuelve no patógeno o inofensivo) mediante métodos conocidos en la técnica o, preferiblemente, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los virus atenuados pueden prepararse mediante la técnica de la presente divulgación que implica el nuevo pase en serie a través de óvulos porcinos fecundados. Los virus atenuados se pueden encontrar en la naturaleza y pueden tener deleciones génicas que se producen de manera natural o, como alternativa, los virus patógenos pueden atenuarse realizando deleciones génicas o produciendo mutaciones génicas.

Las vacunas modificadas genéticamente, que también son deseables, se producen mediante técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas implican, pero no se limitan a, el uso de ARN, ADN recombinante, proteínas recombinantes, virus vivos y similares.

40 Por ejemplo, después de la purificación, el virus de tipo salvaje puede aislarse de muestras clínicas y biológicas adecuadas tales como muestras de suero, heces, saliva, semen y tejido mediante métodos conocidos en la técnica, preferiblemente mediante el método enseñado en el presente documento usando cerdos infectados o líneas celulares adecuadas infectadas. El ADN se extrae del agente infeccioso o virus biológicamente puro mediante métodos conocidos en la técnica y se purifica mediante métodos conocidos en la técnica, preferiblemente mediante ultracentrifugación en un gradiente de CsCl. El ADNc del genoma viral se clona en un huésped adecuado mediante métodos conocidos en la técnica (véase Maniatis *et al.*, *id.*), y luego se analiza el genoma viral para determinar regiones esenciales del genoma para producir partes antigénicas del virus. Después de eso, el procedimiento es generalmente el mismo que para la vacuna viva modificada, una vacuna inactivada o una vacuna de subunidades.

50 Las vacunas modificadas genéticamente basadas en tecnología de ADN recombinante se producen, por ejemplo, identificando la parte del gen viral que codifica para las proteínas responsables de inducir una respuesta inmunitaria o protectora más fuerte en los cerdos (por ejemplo, proteínas derivadas de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2, etc.). Tales genes identificados o fragmentos inmunodominantes pueden clonarse en vectores de expresión de proteínas convencionales, tales como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, O'Reilly *et al.*, "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual." Freeman & Co. (1992)). Las células huésped se cultivan, expresando así las proteínas de vacuna deseadas, que pueden purificarse en el grado deseado y formularse en un producto de vacuna adecuado.

60 Las proteínas modificadas genéticamente, útiles en vacunas, por ejemplo, pueden expresarse en células de insecto, células de levadura o células de mamífero. Las proteínas modificadas genéticamente, que pueden purificarse o aislarse mediante métodos convencionales, pueden inocularse directamente en una especie porcina o de mamífero para conferir protección frente al TTV porcino.

Una línea celular de insecto (como sf9, sf21 o HIGH-FIVE) puede transformarse con un vector de transferencia que contiene ácidos polinucleicos obtenidos del virus o copiados del genoma viral que codifica para una o más de las proteínas inmunodominantes del virus. El vector de transferencia incluye, por ejemplo, ADN de baculovirus linealizado y un plásmido que contiene los polinucleótidos deseados. La línea celular del huésped puede cotransfectarse con el ADN de baculovirus linealizado y un plásmido para producir un baculovirus recombinante.

Alternativamente, el ADN del TTV porcino aislado que codifica para una o más proteínas de la cápside puede insertarse en vectores vivos, tales como un poxvirus o un adenovirus y usarse como vacuna.

Se administra una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna a una especie porcina o de mamífero que necesita protección frente a dicha infección o dicho síndrome. La "cantidad inmunológicamente eficaz" puede determinarse o titularse fácilmente mediante pruebas de rutina. Una cantidad eficaz es aquella en la que se alcanza una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna para proteger al cerdo u otro mamífero expuesto al virus TTV porcino, o coinfección por TTV porcino, que puede provocar síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (SDNP), síndrome de desmedro multisistémico posdestete (SDMP) o enfermedad relacionada. Preferiblemente, la especie porcina u otra de mamífero se protege en un grado en el que uno a todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de la enfermedad viral se encuentran significativamente reducidos, mejorados o prevenidos totalmente.

La vacuna puede administrarse en una dosis única o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden contener, por ejemplo, desde 1 hasta 1.000 microgramos de antígeno basado en virus (dependiendo de la concentración del componente inmunoactivo de la vacuna), pero no deben contener una cantidad de antígeno basado en virus suficiente como para dar como resultado una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección viral. Se conocen métodos en la técnica para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo basándose en el peso del ave o mamífero, la concentración del antígeno y otros factores típicos.

La vacuna puede administrarse a cerdos. Además, la vacuna puede administrarse a seres humanos, tales como los criadores de cerdos que corren un alto riesgo de verse infectados por el agente viral. Se contempla que puede diseñarse una vacuna basada en el TTV porcino para proporcionar una amplia protección frente a TTV tanto porcino como humano. Dicho de otro modo, la vacuna basada en el TTV porcino puede diseñarse preferentemente para proteger frente a la infección por TTV humano a través del denominado "enfoque jeneriano" (es decir, puede usarse la vacuna contra el virus de la viruela vacuna de Edward Jenner). De manera deseable, la vacuna se administra directamente a una especie porcina u otra de mamífero que aún no está expuesta al virus TTV. La vacuna puede administrarse convenientemente por vía oral, por vía intrabucal, por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía parenteral, etc. La vía de administración parenteral incluye, pero no se limita a, las vías intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea.

Cuando se administra como un líquido, la presente vacuna puede prepararse en forma de una disolución acuosa, un jarabe, un elixir, una tintura y similares. Tales formulaciones se conocen en la técnica y se preparan normalmente mediante disolución del antígeno y otros aditivos típicos en los sistemas de portador o disolvente apropiados. Los portadores o disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc. Son aditivos típicos, por ejemplo, los colorantes, sabores, edulcorantes y conservantes antimicrobianos certificados tales como el timerosal (etilmercuriosalicilato de sodio). Tales disoluciones pueden estabilizarse, por ejemplo, mediante la adición de gelatina, sorbitol o medio de cultivo celular parcialmente hidrolizados, y pueden tamponarse mediante métodos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, una mezcla de los mismos, y similares.

Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsionantes en combinación con otros agentes de coformulación convencionales. Estos tipos de formulaciones líquidas pueden prepararse mediante métodos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un molino coloidal. Las emulsiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un homogeneizador.

Las formulaciones parenterales, diseñadas para la inyección en sistemas de líquidos corporales, requieren una isotonicidad y un tamponamiento del pH adecuados para los niveles correspondientes de líquidos corporales de mamíferos. La isotonicidad puede ajustarse adecuadamente con cloruro de sodio y otras sales según sea necesario. Pueden usarse disolventes adecuados, tales como etanol o propilenglicol, para aumentar la solubilidad de los componentes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Otros aditivos que pueden emplearse en la presente vacuna incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las formas de dosificación parenteral también deben esterilizarse antes de su uso.

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser totalmente definitivos en cuanto a las condiciones y el alcance de esta invención. Debe apreciarse que cuando se han facilitado condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), también pueden usarse las condiciones tanto por encima como por debajo de los intervalos especificados, aunque generalmente de manera menos conveniente. Los ejemplos se llevan a cabo a temperatura ambiente (de aproximadamente 23°C a aproximadamente 28°C) y a presión atmosférica.

Todas las partes y porcentajes a los que se hace referencia en el presente documento tienen una base en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifiquen de otro modo.

### Ejemplo 1.

#### *Extracción de ADN viral, PCR anidada y PCR genómica:*

5 En el estudio se usaron muestras de suero y semen convenientes de 20 jabalíes adultos convencionales de una granja porcina de Virginia. Se aisló el ADN total de 20 muestras de suero y 19 muestras de semen usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen). Para examinar las muestras positivas que contenían PTTV, se realizaron inicialmente amplificaciones por PCR anidada de las regiones conservadas en la UTR de PTTV1 y PTTV2 usando la polimerasa AmpliTag Gold (Applied Biosystems). Las dos parejas de cebadores usados para amplificar el fragmento A de PTTV1 fueron TTV1-mF (SEQ ID NO: 45)/TTV1-mR (SEQ ID NO: 46) (para la primera tanda de PCR) y TTV1-nF (SEQ ID NO: 47)/TTV1-nR (SEQ ID NO: 48) (para la segunda tanda de PCR), mientras que las dos parejas de cebadores usados para amplificar el fragmento D de PTTV2 fueron TTV2-mF (SEQ ID NO: 49)/TTV2-mR (SEQ ID NO: 50) (para la primera tanda de PCR) y TTV2-nF (SEQ ID NO: 51)/TTV2-nR (SEQ ID NO: 52) (para la segunda tanda de PCR; figura 1A y tabla 1).

15 Para amplificar las secuencias genómicas de longitud completa de PTTV1 y PTTV2, primero se realizó una PCR genómica inversa usando una pareja de cebadores conservados específicos de gen TTV1-IF (SEQ ID NO: 1)/TTV1-IR (SEQ ID NO: 4) ubicados en la región A para PTTV1 y otra pareja de cebadores específicos de gen TTV2-IF (SEQ ID NO: 5)/TTV2-IR (SEQ ID NO: 8) ubicados en la región D para PTTV2, respectivamente, con ADN polimerasa de fusión Herculase II (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. No se detectaron productos de PCR con los tamaños esperados. Posteriormente, se diseñaron nuevos conjuntos de cebadores para amplificar dos regiones que cubren los genomas completos de PTTV1 y PTTV2 en la segunda tanda de PCR, respectivamente (figura 1A). Las parejas de cebadores usados para amplificar los fragmentos B y C de PTTV1 fueron TTV1-IF (SEQ ID NO: 1)/TTV1-2340R (SEQ ID NO: 2) y TTV1-2311F (SEQ ID NO: 3)/TTV1-IR (SEQ ID NO: 4), respectivamente, mientras que las parejas de cebadores usados para amplificar los fragmentos E y F de PTTV2 fueron TTV2-IF (SEQ ID NO: 5)/TTV2-2316R (SEQ ID NO: 6) y TTV2-GCF (SEQ ID NO: 7)/TTV2-IR (SEQ ID NO: 8), respectivamente (figura 1A y tabla 1). Los fragmentos C y F contienen las regiones ricas en GC de PTTV1 y PTTV2, respectivamente. Se cortaron individualmente los productos de PCR amplificados, se purificaron y se clonaron posteriormente en un vector pSC-B-amp/kan (Stratagene) mediante la estrategia de clonación por PCR StrataClone Blunt según las instrucciones del fabricante (Stratagene) seguido de secuenciación de ADN.

### Ejemplo 2

#### *Examen de muestras positivas de TTV porcino recogidas de jabalíes en una granja de Virginia:*

Se detectó previamente el ADN de TTV porcino de cerdos en diferentes regiones geográficas mediante PCR anidada basándose en la secuencia UTR de una cepa de PTTV1 japonesa Sd-TTV31 (McKeown *et al.*, 2004, citado anteriormente). Con la identificación reciente de PTTV2, se han usado dos conjuntos diferentes de cebadores de PCR anidada para amplificar la región A de PTTV1 y la región D de PTTV2, respectivamente (figura 1A) (Ellis *et al.*, 2008, citado anteriormente; Kekarainen, T., Sibila, M. y Segales, J. (2006). Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 87 (Pt 4), 833-7; Krakowka *et al.*, 2008, citado anteriormente). También se usó un enfoque de detección similar en el presente estudio para identificar cepas de PTTV de cerdos en los Estados Unidos. Para examinar muestras positivas de PTTV1 o PTTV2 autóctonas para su uso posterior para determinar las secuencias genómicas de longitud completa, se sometieron a análisis de PCR anidada 20 sueros (SR n.º 1-20) y 19 muestras de semen (SM n.º 1-18 y SM n.º 20) recogidos de 20 jabalíes en una granja de Virginia. Sorprendentemente, las 20 muestras de suero fueron positivas para PTTV1 y 19 también fueron positivas para PTTV2 (excepto SR n.º 18). En cambio, sólo 1 muestra de semen (SM n.º 6) fue positiva para PTTV1 y 3 muestras de semen (SM n.º 8, 9 y 20) fueron positivas para PTTV2. El resultado concordó con un estudio reciente en el que se demostró que las muestras de semen de jabalí eran positivas para el ADN de PTTV en España (Kekarainen, T., Lopez-Soria, S. y Segales, J. (2007). Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology* 68 (7), 966-71), lo que sugiere una posible transmisión vertical de PTTV. Sin embargo, las tasas de prevalencia tanto de PTTV1 como de PTTV2 en semen fueron mucho menores que en los sueros, lo que sugiere que no existe una asociación directa para la presencia de ADN de PTTV en sueros y semen del mismo cerdo.

### Ejemplo 3

#### *Análisis de secuencia y filogenéticos:*

Se realizaron análisis genéricos y la alineación de las secuencias de aminoácidos y ADN usando el paquete Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las secuencias genómicas de tres cepas de PTTV conocidas y sus números de registro de GenBank correspondientes usados para la alineación y comparación son Sd-TTV31 (AB076001), TTV-1p (AY823990) y TTV-2p (AY823991). Se realizaron comparaciones de secuencias por parejas (PASC) usando 121 secuencias genómicas de longitud completa de cepas relacionadas con TTV humanos y animales disponibles en GenBank con un programa PASC en línea

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/viridty.cgi?textpage=overview>) (Bao *et al.*, 2008).

Se construyeron árboles filogenéticos mediante el método de unión de vecinos en el programa PAUP 4.0 (David Swofford, Smithsonian Institute, Washington, DC, distribuido por Sinauer Associate Inc.) basándose en las secuencias genómicas de longitud completa y las secuencias de aminoácidos deducidas de 4 ORF de siete cepas de PTTV. Se obtuvieron los datos de 1000 nuevas tomas de muestras.

#### Ejemplo 4

##### *Diseño de cebadores de PCR para diagnosticar infección por PTTV porcino*

Se realizaron los análisis y la alineación de secuencias de ADN usando el paquete Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las secuencias genómicas de longitud completa de diez cepas de TTV porcino y sus números de registro de GenBank correspondientes usados para la alineación fueron los siguientes. Especies PTTV1: Sd-TTV31 (AB076001), PTTV1a-VA (GU456383), TTV-1p (AY823990), PTTV1b-VA (GU456384), swSTHY-TT27 (GQ120664) y TTV1#471819 (GU188045). Especie PTTV2: PTTV2b-VA (GU456385), PTTV2c-VA (GU456386), TTV-2p (AY823991) y TTV2#472142 (GU188046). Se identificaron las secuencias conservadas entre los 6 genomas de PTTV1 y 4 de PTTV2, respectivamente, y posteriormente se usaron para guiar las selecciones de cebadores de PCR en tiempo real usando el programa Beacon Designer (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA). Los cebadores usados para la PCR anidada dúplex de PTTV1 se diseñaron mediante el paquete Lasergene.

#### Ejemplo 5

##### *Curvas patrón de PCR en tiempo real de PTTV1 y PTTV2*

Se volvió a amplificar una región de 2091 pb correspondiente al fragmento B de PCR del genoma de PTTV1b-VA a partir del mismo fragmento de PCR usando los cebadores TTV1-IF (5'-CATAGGGTGTAAACCAATCAGATTTAAGGCGTT-3') y TTV1-2340R (5'-GGTCATCAGACGATCCATCTCCCTCAG') tal como se describió anteriormente (Huang *et al.*, 2010). Se purificó en gel el amplicón resultante mediante el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) y se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop que se usó para el molde patrón de PCR en tiempo real de la especie 1 de TTV porcino. Se construyó un clon de ADN de longitud completa de la cepa de PTTV2c-VA, pSC-PTTV2c, ensamblando los fragmentos E y F de PCR de PTTV2c-VA en el vector pSC-B-amp/kan (Huang *et al.*, datos no publicados). Se usó el plásmido pSC-PTTV2c (7082 pb) para el molde patrón de PCR en tiempo real de la especie 2 de TTV porcino y se midió la concentración de ADN de plásmido mediante un espectrofotómetro NanoDrop. Se usó una serie de diluciones de 10 veces de los dos moldes para generar las curvas patrón de PCR en tiempo real, respectivamente.

#### Ejemplo 6

##### *Extracción de ADN viral para ensayos de PCR*

Se aisló el ADN total de 20 muestras de suero y 19 muestras de semen recogidas de 20 jabalíes adultos convencionales (sin síndromes clínicos) de una granja porcina de Virginia usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen) tal como se describió anteriormente (Huang *et al.*, 2010). Se usó un volumen de muestra de 400 µl para suero y semen para extraer ADN con un eluato final de 50 µl de agua estéril. Todas las muestras de ADN extraídas se almacenaron a -20°C hasta las pruebas de PCR en tiempo real. La detección de TTV porcinos en estas muestras mediante PCR anidada convencional se había descrito previamente (Huang *et al.*, 2010). El ADN total extraído de una muestra de suero de cabra con el mismo procedimiento se usó como control negativo.

#### Ejemplo 7

##### *Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real con verde SYBR*

Se realizaron PCR en tiempo real específicas de PTTV1 y PTTV2, respectivamente, usando el kit de SYBR y fluoresceína SensiMix (Quantace Ltd) y el instrumento para PCR en tiempo real MyiQ iCYCLER (BIO-RAD Laboratories). Cada reacción de 25 µl contenía 12,5 µl de mezcla maestra de verde SYBR, 4 µl de ADN extraído, 0,5 µl de cada cebador (10 nM) y 7,5 µl de agua estéril. La condición de PCR para PTTV1 fue de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de amplificación (15 s a 95°C, 30 s a 59,4°C, 10 s a 72°C). Esto estuvo seguido inmediatamente por un análisis del punto de fusión obtenido aumentando gradualmente la temperatura desde 55°C hasta 95°C, midiéndose la señal de fluorescencia cada 0,5°C. La condición de PCR para PTTV2 fue la misma que para PTTV1, excepto en que la temperatura de hibridación fue de 56°C. Se incluyeron moldes patrón de PTTV1 y PTTV2 como controles positivos en cada ejecución. Se llevaron a cabo la amplificación y el análisis de datos usando el software MyiQ System (BIO-RAD Laboratories). Todas las muestras se procesaron por duplicado en la misma placa.

#### Ejemplo 8

##### *Especificidad y sensibilidad de dos ensayos singleplex*

Las temperaturas de hibridación óptimas para la amplificación de los ensayos específicos de PTTV1 y PTTV2 fueron

de 59,4°C y 56°C, respectivamente, según se determinó mediante una dilución de amplificaciones de 10 veces usando un gradiente de temperaturas de hibridación. La amplificación del producto de 118 pb usando los cebadores TTV1F/TTV1R se obtuvo sólo con el molde de PTTV1, mientras que la amplificación del producto de 200 pb con el molde de PTTV2 sólo se observó cuando se usaron los cebadores TTVF4/TTVR4. Ninguno de los ensayos produjo amplificación cruzada del otro, lo que confirmó la especificidad de los cebadores y las dianas (datos no mostrados).

Se estableció una curva patrón de PTTV1 a lo largo de un intervalo de concentraciones de ADN objetivo por 25 µl. Se demostró que el intervalo lineal abarcaba de  $4,4 \times 10^1$  a  $4,4 \times 10^8$  copias. El límite de detección mínimo (44 copias) correspondió a un ciclo umbral ( $C_t$ ) de 37,57. Se consideró que las muestras sometidas a prueba con  $C_t > 37,57$  estaban por debajo del límite de detección y no pudieron cuantificarse. De manera similar, se generó una curva patrón de PTTV2 y se usó para detectar la concentración de ADN que oscilaba desde  $8,6 \times 10^0$  hasta  $8,6 \times 10^8$  copias por reacción de 25 µl. La  $C_t$  correspondiente del límite de detección mínimo (8,6 copias) fue de 36,53. Todas las muestras que se consideraron positivas para PTTV1 o PTTV2 tenían números de copias menores que el límite de detección máximo respectivo. Las curvas de fusión usando una dilución de 10 veces del molde patrón de PTTV1 o PTTV2 (figuras 6a y 6b; curvas de color azul), así como 20 muestras de suero de jabalí, presentaron temperaturas de fusión ( $T_f$ ) de 87,0°C para PTTV1 y 80,0°C para PTTV2, respectivamente (figuras 6a y 6b; curvas de color rojo). No se observaron picos para los controles negativos que usaron agua estéril o ADN de suero de cabra como moldes (figuras 6a y 7b; líneas de color negro).

Ejemplo 9

*Cuantificación de TTV1 y TTV2 porcinos en muestras de suero y semen de jabalí*

Se expresó la carga viral como números de copias de los genomas de PTTV1 o PTTV2 por ml de muestras de suero de jabalí originales. Se detectó ADN de PTTV1 en las 20 muestras de suero que oscilaban desde  $1,91 \times 10^3$  hasta  $3,25 \times 10^5$  copias/ml, mientras que se detectó ADN de PTTV2 en 19 muestras de suero (excepto la n.º 10) que oscilaban desde  $3,59 \times 10^2$  hasta  $1,39 \times 10^6$  copias/ml. El resultado concordó con un estudio anterior mediante el uso de PCR anidada convencional (tabla 5). Ninguna de las muestras de semen fue positiva para PTTV1, mientras que tres muestras de semen fueron positivas para PTTV2 con cargas virales muy bajas (230, 244 y 357 copias/ml, respectivamente).

Tabla 5. Comparación de la detección de TTV porcinos mediante diferentes ensayos en 20 muestras de suero y 19 muestras de semen de jabalíes adultos en una granja de Virginia.

Muestras	N.º de positivos/n.º total sometidos a prueba mediante diferentes ensayos				
	PCR en tiempo real de PTTV1	PCR anidada de PTTV1	PCR en tiempo real de PTTV2	PCR anidada de PTTV2	PCR en tiempo real dúplex de PTTV1/PTTV2
PTTV1 en suero	20/20	20/20	-	-	20/20
PTTV2 en suero	-	-	19/20	19/20	19/20
PTTV1 en semen	0/19	1/19	-	-	-
PTTV2 en semen	-	-	3/19	3/19	-

Ejemplo 10

*Ensayo de PCR en tiempo real dúplex de PTTV1/PTTV2*

Se realizó el ensayo de PCR en tiempo real dúplex de PTTV1/PTTV2 en un sistema de PCR de 25 µl que contenía 12,5 µl de mezcla maestra de verde SYBR, 0,5 µl de cada cebador de PTTV1, 0,5 µl de cada cebador de PTTV2, 4 µl de ADN y 6,5 µl de agua estéril. La condición de PCR dúplex y el análisis del punto de fusión fueron los mismos que con PTTV1, excepto en que la temperatura de hibridación fue de 58°C. Se analizaron los picos de fusión para distinguir los amplicones específicos de PTTV1 y PTTV2.

Ejemplo 11

*PCR anidada dúplex*

Se realizó la PCR de primera tanda con una mezcla Platinum PCR HiFi Supermix (Invitrogen) usando 4 µl de ADN extraído en un volumen total de 50 µl. La condición de PCR fue de 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 30 s con una desnaturalización inicial del ADN molde a 94°C durante 2 min. Se usó una alícuota de 4 µl del producto de PCR de primera tanda para la PCR de segunda tanda con los mismos reactivos y condición de PCR. Se usó una pareja de cebadores P1ab-mF/P1ab-mR en la primera tanda de PCR, mientras que se usaron una mezcla de dos parejas de cebadores, P1a-nF/P1a-nR para la detección de PTTV1a y P1b-nF/P1b-nR para la detección de PTTV1b, en la segunda tanda de PCR (tabla 1). Se visualizaron los productos de amplificación

mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se diferenciaron dos bandas específicas para cada tipo mediante luz UV.

#### Ejemplo 12

##### *Construcción de plásmidos de expresión de ORF de PTTV1 y PTTV2*

5 Se amplificaron las partes C-terminales de ORF1 de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2c a partir de los clones de ADN de longitud completa respectivos (pSC-PTTV1a, pSC-PTTV1b y pSC-PTTV2c; descritos en otro lugar). Se esperaba que los fragmentos amplificados codificaran para productos proteicos con 319 aa para PTTV1a (posiciones de aa de ORF1 317-635 (SEQ ID NO: 13); n.º de registro de GenBank GU456383), 318 aa para PTTV1b (posiciones de aa de ORF1 322-639 (SEQ ID NO: 14); n.º de registro de GenBank GU456384) y 316 aa para PTTV2c (posiciones de aa de ORF1 310-625 (SEC ID NO: 16); n.º de registro de GenBank GU456386), respectivamente. También se amplificó un fragmento truncado C-terminal de PTTV1b que codifica para 248 aa (posiciones de aa de ORF1 322-569 (SEQ ID NO: 14)) y se usó como control de comparación para el análisis de SDS-PAGE. Todos los plásmidos se construyeron mediante la clonación de los productos de PCR en un vector de expresión triple en *E. coli*/baculovirus/células de mamífero pTriEx1.1-Neo (Novagen) entre los sitios de restricción NcoI y XhoI para generar proteínas de fusión C-terminal con cola de 8 × His. Los cuatro plásmidos recombinantes se designaron como pTri-PTTV1a-ORF1, pTri-PTTV1b-ORF1, pTri-PTTV1b-ORF1ctruc y pTri-PTTV2c-ORF1. Todas las secuencias clonadas se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

#### Ejemplo 13

##### *Expresión de proteínas recombinantes PTTV1 y PTTV2*

20 Se transformaron los cuatro plásmidos de expresión en células competentes Rosetta 2 (DE3) pLacI (Novagen), respectivamente, y se sembraron las bacterias sobre placas de agar LB que contenían ampicilina 100 µg/ml durante la noche a 37°C. Se usó una colonia de transformación individual para cada constructo para inocular 3 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina (LB/amp), y se cultivó durante 6-8 horas a 37°C. Se usó entonces el cultivo turbio de 3 ml para cada constructo para producir disoluciones madre bacterianas mediante la adición de glicerol esterilizado por filtración al 25% y la congelación del cultivo a -80°C. Antes de la purificación, se usaron 10 µl de la disolución madre bacteriana congelada para cada constructo para inocular un cultivo iniciador de 3 ml de LB/amp, y se hizo crecer durante 6-8 horas a 37°C. Se inocularon 100 ml de medios Overnight Express TB (Novagen) con el cultivo iniciador para inducir la expresión de proteínas, y se hizo crecer durante 16-18 horas a 37°C. Después de la incubación, se centrifugó el cultivo de autoinducción a 3400 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante resultante para cada constructo, y se reservó cada uno de los sedimentos bacterianos a -20°C hasta su uso.

#### Ejemplo 14

##### *Purificación y diálisis de proteínas recombinantes.*

35 Las proteínas recombinantes eran insolubles y se expresaron dentro de los cuerpos de inclusión bacterianos. Se trató cada uno de los sedimentos bacterianos con BugBuster y rLysozyme según el protocolo de fabricación (Novagen), y se añadió nucleasa Benzonase (Novagen) para la degradación del ADN y el ARN. Posteriormente se resuspendió cada uno de los sedimentos de cuerpos de inclusión con 840 µl de tampón de lisis (clorhidrato de guanidina 6 M, fosfato de sodio 0,1 M, Tris-cloruro 0,01 M, imidazol 0,01 M, pH 8,0) y se congeló a -80°C durante al menos 30 minutos. Luego se descongeló, se diluyó con 2,5 ml adicionales de tampón de lisis y se hizo rotar suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes de lisado mediante centrifugación a 15.000 × g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una suspensión al 50% de Ni-NTA His-bind (Novagen) a cada uno de los sobrenadantes decantados, y se agitaron las mezclas durante 60 minutos a temperatura ambiente para fomentar la unión de la cola de His. Se cargaron las mezclas de lisado/resina en una columna de cromatografía vacía. Después de la fracción no retenida inicial, se añadieron 7 ml de tampón de lisis a la columna y se permitió que fluyera a su través. Luego, se lavó cada columna 2 veces con 7 ml de tampón de lavado (urea 8 M, fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,15 M, imidazol 0,02 M, pH 8,0). Se logró la elución de la proteína diana mediante la adición de 4 alícuotas de 1 ml independientes de tampón de elución (urea 8 M, fosfato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 1 M, imidazol 0,5 M, pH 8,0) a la columna. Se analizaron las cuatro fracciones de elución mediante SDS Page y tinción con azul de Coomassie.

50 Se inyectaron las eluciones que contenían concentraciones significativas de la proteína diana, en un casete de diálisis de 0,5 ml - 3 ml con un punto de corte de peso molecular de 20.000 (Pierce). Se usaron una serie de 4 tampones de diálisis para diálisis; tampón de diálisis 1 (urea 6 M, fosfato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,8 M, imidazol 0,3 M, pH 8,0), tampón de diálisis 2 (urea 4 M, fosfato de sodio 0,033 M, cloruro de sodio 0,533 M, imidazol 0,2 M, pH 8,0), tampón de diálisis 3 (urea 2,67 M, fosfato de sodio 0,022 M, cloruro de sodio 0,356 M, imidazol 0,133 M, pH 8,0) y tampón de diálisis 4 (urea 1,5 M, fosfato de sodio 0,0148, cloruro de sodio 0,237 M, imidazol 0,089 M, pH 8,0). Se sumergió el casete de diálisis secuencialmente y se hizo rotar en cada tampón de diálisis durante más de 6 horas a 4°C. Cuando se completó la diálisis, se retiraron de los casetes cada una de las proteínas

de fusión recombinantes con cola de His, se cuantificaron usando un instrumento NanoDrop y se congelaron a -80°C.

#### Ejemplo 15

##### *SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de anticuerpo anti-cola de His*

5 Se desarrolló una inmunotransferencia de tipo Western para detectar proteínas recombinantes purificadas mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-cola de His 6x (Rockland). Se mezclaron volúmenes iguales de cada una de las proteínas ORF1 truncadas purificadas y LDS/ $\beta$ -ME al 10%, y se llevaron a ebullición a 95°C durante 10 minutos. Se añadieron 10  $\mu$ l de la muestra llevada a ebullición a cada pocillo apropiado de un gel de poliacrilamida-Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen), y se ejecutó a 200 voltios durante 43 minutos en tampón de ejecución 1  $\times$  MES (Invitrogen). Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad) usando un aparato de transferencia semisecco Trans blot y tampón de transferencia 1  $\times$  (Invitrogen). Una vez que se completó la transferencia, se incubó la membrana de PVDF en tampón de bloqueo Odyssey (Li-Cor) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó el Acm anti-cola de His 6  $\times$  a 1:1000 en tampón de bloqueo Odyssey/Tween 20 al 0,2%, y se transfirió a la membrana después de retirar el tampón de bloqueo Odyssey anterior. Se dejó el Acm en un agitador oscilante para incubación con la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente o 4°C durante la noche, y luego se lavó la membrana 3 veces con solución salina tamponada con Tris/Tween 20 al 0,05% (TBS-T, Sigma). Se diluyó un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo IRDye 800 (Li-Cor) a 1:5000 en tampón de bloqueo Odyssey/Tween 20 al 0,2%/SDS al 0,1%. Se transfirió a la membrana de PVDF recién lavada y se permitió que incubase durante 1 hora a temperatura ambiente con oscilación suave. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T, 1 vez con TBS y se obtuvieron imágenes con el instrumento Li-Cor Odyssey.

#### Ejemplo 16

##### *Inmunotransferencia de tipo Western de suero*

Se desarrolló una inmunotransferencia de tipo Western de suero, y se usó para identificar controles de suero positivos y negativos para el desarrollo de ELISA. Después de SDS-PAGE tal como se describió anteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF que se incubó posteriormente en tampón de bloqueo Odyssey (Li-Cor) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó una muestra de suero seleccionada a 1:100 en tampón de bloqueo Odyssey/Tween 20 al 0,2%, y se transfirió a la membrana después de retirar el tampón de bloqueo Odyssey anterior. Se dejó la muestra de suero en un agitador oscilante para incubar con la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente, y luego se lavó la membrana 3 veces con solución salina tamponada con Tris/Tween 20 al 0,05% (TBS-T, Sigma). Se diluyó un anticuerpo de cabra anti-IgG de cerdo IRDye 800 (Rockland) a 1:2500 en tampón de bloqueo Odyssey/Tween 20 al 0,2%/SDS al 0,1%. Se transfirió a la membrana de PVDF recién lavada y se permitió que incubase durante 1 hora a temperatura ambiente con oscilación suave. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T, 1 vez con TBS y se obtuvieron imágenes con el instrumento Li-Cor Odyssey.

#### Ejemplo 17

##### *ELISA indirecto específico de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2*

Las concentraciones óptimas de los antígenos usados para recubrir las placas y las diluciones de antisueros y conjugados se determinaron mediante titulación en formato de tablero de ajedrez. El ELISA se inició diluyendo cada una de las proteínas de fusión recombinantes con cola de His purificadas (PTTV1a, PTTV1b y PTTV2c, respectivamente) a 680 ng/ml en tampón de recubrimiento de carbonato 1  $\times$  (CCB) a un pH de 9,6, y recubriendo placas de ELISA de unión al medio (Greiner) con 100  $\mu$ l/pocillo. Se cubrieron las placas y se permitió que incubasen a 37°C durante 2 horas. Después del recubrimiento, se retiraron las proteínas diluidas y se lavó cada pocillo 3 veces con 300  $\mu$ l de TBS-T 1  $\times$ . Se añadió luego tampón de bloqueo libre de proteínas (Pierce) a un volumen de 300  $\mu$ l/pocillo, y se permitió que incubasen las placas a 37°C durante 1 hora. Mientras tanto, en un bloque de dilución de 96 pocillos, se diluyeron las muestras de suero a 1:100 en 150  $\mu$ l de tampón de bloqueo libre de proteínas. Luego se retiró el bloque y se transfirieron 100  $\mu$ l de cada muestra de suero diluida a cada pocillo correspondiente en las placas de ELISA. Se permitió que incubasen las placas a 37°C durante 2 horas, después de lo cual se lavó cada pocillo 3 veces con 300  $\mu$ l de TBS-T. A continuación, se diluyó el anticuerpo anti-IgG de cerdo conjugado con HRP (Rockland) a 1:4000 en 12 ml de bloque libre de proteínas, y se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo de las placas. Esto se incubó a 37°C durante 1 hora, y luego se lavó cada pocillo 3 veces con 300  $\mu$ l de TBS-T. Para desarrollar el ELISA, se añadieron 100  $\mu$ l de Sure Blue Reserve 1-Component (KPL) a cada pocillo de las placas. Después de 20 minutos, se añadieron 100  $\mu$ l de HCL 1 N a cada pocillo para detener el desarrollo. Luego se leyeron las placas a 450 nm.

#### Ejemplo 18

##### *Análisis de datos*

55 Se usaron sueros porcinos usados en la investigación en cultivo celular de una empresa comercial (fabricados en

Nueva Zelanda y considerados libres de todas las enfermedades según la OIE) como control positivo para los tres protocolos de ELISA porque los sueros eran todos positivos para PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 tal como se detectó mediante inmunotransferencia de tipo Western de suero y presentaron altos valores de D.O. (> 2,0). Inicialmente, se usaron sueros de cerdo gnotobióticos reunidos como control negativo, ya que fueron negativos en la detección mediante inmunotransferencia de tipo Western. Posteriormente, en comparación con los sueros de cerdo gnotobióticos negativos, se seleccionaron algunos sueros porcinos recogidos de una granja porcina convencional en Wisconsin. También fueron negativos en la detección mediante inmunotransferencia de tipo Western y sus valores de D.O. correspondieron a los de los sueros de cerdo gnotobióticos negativos. Estos sueros porcinos convencionales se reunieron y se usaron como control negativo. El valor de punto de corte para cada ELISA se calculó como el valor medio de D.O. del grupo de control negativo (n = 4) más 3 veces la desviación estándar.

#### Ejemplo 19

##### *Construcción de clones de ADN genómico de longitud completa de TTV1a, 1b y 2c porcinos*

Se volvieron a amplificar los fragmentos B y C de PCR del aislado estadounidense PTTV1a-VA (n.º de registro de GenBank GU456383) a partir de los constructos descritos anteriormente, y se ensamblaron posteriormente para dar un ADN genómico de longitud completa con un sitio BamH I en ambos extremos del genoma mediante PCR solapante usando la ADN polimerasa de fusión Herculase II (Stratagene) en el vector pSC-B-amp/kan (Stratagene). El constructo resultante se designó como pSC-PTTV1a (figura 17A). Usando la misma estrategia, se construyeron el clon pSC-PTTV1b (figura 17B) originado a partir del aislado estadounidense PTTV1b-VA (n.º de registro de GenBank GU456384) y el clon pSC-PTTV2c (figura 17C) originado a partir del aislado estadounidense PTTV2c-VA (El n.º de registro de GenBank (GU456386) con los mismos sitios de restricción (BamH I) en el mismo vector de estructura principal. El plásmido TTV2-#471942-full (figura 17E) que contiene un ADN genómico de longitud completa se originó a partir de un aislado de TTV2 porcino patógeno de Alemania. TTV2-#471942 fue un obsequio del Dr. Andreas Gallei (BIVI, Alemania). TTV2-#471942 se clasificó en el subtipo 2b de TTV porcino junto con el aislado estadounidense PTTV1b-VA basándose en el análisis filogenético (datos no mostrados).

#### Ejemplo 20

##### *Construcción de clones de ADN dimerizados en tándem de TTV2b y 2c porcinos*

Se cortó el genoma completo de PTTV2c del clon pSC-PTTV2c mediante digestión con BamH I, se purificó y se ligó para formar concatémeros. Se clonaron los concatémeros ligados en el vector pSC-B-amp/kan digerido previamente con BamH I para producir un clon de ADN dimerizado en tándem, pSC-2PTTV2c-RR (figura 1D). De manera similar, se generó un clon de ADN dimerizado en tándem, pSC-2PTTV2b-RR, a partir del clon TTV2-#471942-full usando sitios de restricción EcoR V (figura 1F).

#### Ejemplo 21

##### *Generación de anticuerpos policlonales anti-ORF1 específicos de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2*

El producto que codifica para ORF1 es la supuesta proteína de la cápside de TTV. Para generar anticuerpos policlonales anti-ORF1 específicos de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 para detectar la expresión de proteínas ORF1 de PTTV y para determinar la infectividad de los clones de ADN de PTTV, se expresaron las tres proteínas ORF1 de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2c en *E. coli*, se purificaron y posteriormente se usaron para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda, respectivamente, como un servicio de producción de anticuerpos personalizado en Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Cada anticuerpo policlonal anti-ORF1 se produjo a partir de suero de conejos inmunizados.

#### Ejemplo 22

##### *Transfección in vitro de clones infecciosos de PTTV*

Se sembraron células PK-15 a  $2 \times 10^5$  células por pocillo sobre una placa de 6 pocillos y se hicieron crecer hasta el 60%-70% de confluencia antes de la transfección. Se transfectaron los clones de ADN pSC-2PTTV2b-RR y pSC-2PTTV2c-RR directamente en células PK-15, respectivamente, usando Lipofectamine LTX (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Para los clones pSC-PTTV1a, pSC-PTTV2c y TTV2-#471942-full, se usaron sus concatémeros ligados, producidos tal como se describió anteriormente, para la transfección, respectivamente. Se cultivaron las células durante de 3 a 5 días, y luego se aplicaron a un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) para detectar la expresión de ORF1 de TTV porcinos. Alternativamente, se sometieron a pases las células transfectadas en nuevas placas de 6 pocillos y se continuó su cultivo durante 3 días antes de la detección mediante IFA.

#### Ejemplo 23

##### *Ensayo de inmunofluorescencia (IFA)*

Se lavaron las células transfectadas o sometidas a pases, 2 veces con PBS y se fijaron con acetona. Se añadieron quinientos microlitros de los anticuerpos, específicos para PTTV1a o PTTV2 a una dilución 1:500 en PBS, sobre las

células y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces con PBS y luego se añadieron 500 µl de IgG de cabra anti-conejo marcada con Texas red o Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una dilución 1:200. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente y de lavare con PBS, se tiñeron las células con 500 µl de DAPI (KPL, Inc.) a una dilución 1:1000 y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia.

5 Ejemplo 24

*Inoculación in vivo de cerdos convencionales con los clones de TTV2 porcino dimerizados en tándem.*

Se realizó un estudio de inoculación de cerdos para determinar las infectividades de los dos clones de TTV2 porcino dimerizados en tándem: pSC-2TTV2b-RR y pSC-2TTV2c-RR. Brevemente, se asignaron aleatoriamente ocho cerdos convencionales de 4 semanas de edad que eran seronegativos y negativos para el ADN viral para TTV2 porcino a dos grupos de cuatro cada uno. Cada grupo de cerdos se alojó por separado y se mantuvo en condiciones que cumplían con todos los requisitos del Comité Institucional sobre Cuidado y Uso de Animales.

A todos los cerdos en cada grupo se les inyectó una combinación tanto por vía intraganglios linfáticos como por vía intramuscular. A los cuatro cerdos (n.<sup>os</sup> 181, 189, 192 y 193) se les inyectó a cada uno 200 µg del ADN de plásmido pSC-2TTV2b-RR, mientras que a otros cuatro cerdos (n.<sup>os</sup> 92, 180, 188 y 191) se les inocularon 200 µg del clon pSC-2TTV2c-RR. Se monitorizaron los cerdos diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad durante un total de 28 días. Se realizó necropsia de todos los cerdos a los 28 días después de la inoculación.

Aunque la presente invención se ha ilustrado mediante la descripción de varias realizaciones y aunque las realizaciones ilustrativas se han descrito con detalle, los solicitantes no tienen la intención de restringir o limitar en modo alguno el alcance de las reivindicaciones adjuntas a tal detalle. Se les ocurrirán modificaciones adicionales fácilmente a los expertos en la técnica. Por tanto, la invención en sus aspectos más amplios no se limita a los detalles específicos, aparatos y métodos representativos, y ejemplos ilustrativos mostrados y descritos.

**Lista de secuencias**

<110> Virginia Tech Intellectual Properties

Huang, Dr. Yaowei

25 Meng, Dr. Xiang-Jin

<120> DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR TORQUE TENO VIRUS PORCINO Y VACUNAS DE TORQUE TENO VIRUS PORCINO

<130> 124617-00306

<150> Documento US 61/235.833

30 <151> 21-08-2009

<150> Documento US 61/316.519

<151> 23-03-2010

<160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> Torque teno virus

<400> 1

cataggggtg aaccaatcag atttaaggcg tt

40 <210> 2

<211> 27

<212> ADN

	<213> Torque teno virus	
	<400> 2	
	ggtcacacaga cgatccatct ccctcag	27
	<210> 3	
5	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 3	
	cttctgaggg agatggatcg tctgatga	28
10	<210> 4	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 4	
15	ttgagctccc gaccaatcag aattgact	28
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
20	<400> 5	
	ttgtgccgga gctcctgaga gc	22
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Torque teno virus	
	<400> 6	
	aggctcttga ggagtcgtcg cttg	24
	<210> 7	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 7	
	taccaggcg gttagacact cagctct	27
	<210> 8	
35	<211> 27	
	<212> ADN	

<213> Torque teno virus

<400> 8

ctcaagcacg agcagtgat cctctca

27

<210> 9

5 <211> 2878

<212> ADN

<213> Torque teno virus

<400> 9

tacacttccg ggttcaggag gctcaatttg gctagcttcg ctgcaccac gtttgctgcc	60
aggcggacct gattgaagac tgaaaaccgt taaattcaaa tttgaaaatg gcgggcaaaa	120
tggcgggaagg gggcgggagt ttatgcaaat taatttatgc aaagtaggag gagctcgatt	180
ttaatttatg caaagtagga ggagtcaatt ctgattggtc gggagctcaa gtcctcattt	240
gcatagggtg taaccaatca gatttaaggc gttcccccaa aagtgaatat aagtaagcgc	300
agttccgaat ggctgagttt atgccgccag cggtagacag aactgtctag cgactgggcg	360
ggtgccggag gatccctgat ccggagtcaa ggggcctatc gggcaggagc agctgagcgg	420
agggcctaca tgaaggagaa agactactgg gaggaagcct ggctgaccag ctgtacatct	480
atacacgacc accactgcaa ctgctgtagc tggagagacc acctgtggac gctatgcgct	540
ttagacgacg cagatttggc cgccgccgca gatattatag aaagagaaga ggcggatgga	600
ggagaagatt tcggattcgt agacggagac cctggagacg ctggcgggta aggagatggc	660
ggcgttccgt cttccgtaga gggggacgta gagcgcgcc ctaccgcatt agcgcttggg	720
accctaaggt tctcagaaac tgccgcatca cgggatggtg gccagttata cagtgtatgg	780
acgggatgga gtggataaaa tacaagccta tggacttaag agtcgaggca aactggatat	840

ES 2 767 781 T3

tcaataaaca ggacagtaaa atagagacag aacagatggg atacctgatg cagtatggag 900  
gagggtggtc aagcggagta atcagcttag agggactatt caatgaaaac agactgtgga 960  
gaaatatatg gtcaaaaagc aatgacggga tggacttggg cagatacttt ggctgtagaa 1020  
ttagactata tccaacagag aatcaggact acttgttctg gtatgacaca gaatttgacg 1080  
aacagcaaag gagaatgcta gatgaataca cacaacctag tgtgatgctg caggctaaaa 1140  
actcgcgtct aatagtgtgt aacagaaga tgccaattag acgcagagta aaaagtattt 1200  
ttataccgcc gcctgcacag ttaacaactc agtggaaatt tcaacaggaa ctatgtcagt 1260  
ttccactgtt taactgggcc tgtatctgca tagacatgga cacgccgttc gactacaacg 1320  
gcgcatggcg aatgcctgg tggctaata gaaggctgca aaacggaaac atggagtaca 1380  
tagaaagatg gggcagaata ccaatgacag gagacacaga actaccacca gcagacgact 1440  
tcaaggcagg aggggtgaac aaaaacttca aaccgacagg tattcaaaga atatacccga 1500  
tagtagcggg atgccttgta gaagggaaca aaagagtagt caaatgggcc acagtacaca 1560  
atggtcccat agacagatgg agaaaaaac agacaggaac tttaaagctc tctaacctga 1620  
gaggcctagt actgagagta tgctcagaga gtgaaacata ctataagtgg acaggatcag 1680  
aatttacagg ggcatttcaa caagactggg gccagtagg cggaaacagaa taccgccttt 1740  
gtaccattaa aatggacca gaatatgaaa accctacagt agaggtatgg tcctgaaag 1800  
caaatatacc gacatcaggg actcttaaag actacttcgg actgagtaca gggcaacagt 1860  
ggaaagacac tgactttgcg aggctgcaac tacctagaag cagccacaat gtggactttg 1920  
gacataaagc tagatttggg ccattttgcg ttaaaaagcc tccagtagag ttcagagata 1980  
cagcccaaaa cccactaaat atatgggtaa aatacacgtt ctattttcag ttcggcggca 2040  
tgtaccagcc tcccaccgga atccaagatc cctgcacttc taaccgacc tatcctgtca 2100  
gaatggtcgg agcagttaca caccctaaat acgccgggca aggcggaatc acgacccaaa 2160  
ttggagatca aggtatcacc gctgcctcta tccgtgccat cagtgcagct ccaccagata 2220  
cctacacgca gtcggcgctc ctcaaagccc cggaaaccga gaaagaagag gaaagagaga 2280  
gtgagaccag tttcacgagt gccgaaagct cttctgaggg agatggatcg tctgatgacc 2340  
aagcagagag acgcgctgcc agaaagcag tcatcaagtt acttctcaag cgactcgtg 2400  
acagaccctg ggacaacaag cgacgacgat tttcagagt accctgacc cctcaccaat 2460  
aaacgcaaaa aacgcttgca attctaactc tgtctctgtg acttcattgg gggggtccgg 2520  
gggggcttgc cccccgtta gttgggttct cgcactcccg cctgccaagt gaaactcggg 2580  
gaggagtgag tgogggacat cccgtgtaat ggctacataa ctaccggct ttgcttcgac 2640  
agtggcctg gctcgaccct cacacaacac tgagatagg gggcgcaatt gggatcgta 2700  
gaaaactatg gccgagcatg gggggggctc cgccccccc aaccccccg gtgggggggg 2760  
caaggcccc cctacacccc cccatggggg gctgccgccc cccaaacccc ccgctcgga 2820  
tggggggggg tgogcccccc ccaaaccccc cttgccgggg gctgtgcccc ggaccccc 2878

<210> 10

<211> 2875

5 <212> ADN

ES 2 767 781 T3

<213> Torque teno virus

<400> 10

tacacttccg ggttcaggag gctcaatthg gctcgccttcg ctgcaccac gtttgctgcc	60
aagcggacct gattgaagac tgacaaccgt tacattcaaa tttgaaaatg gcgcccacac	120
atggcggcgg ggggcccaggt ttatgcaaat taatttatgc aaagtaggag gagctccatt	180
ttaatttatg caaagtagga ggagtcaatt ctgattggtc gggagctcaa gtcctcattt	240
gcatagggtg taaccaatca gatttaaggc gttcccatta aagcgaatat aagtaagtga	300
ggttccgaat ggtgagttt atgccgccag cggtagacag aactgtctag cgactggcgg	360
ggtgccggag gatccctgat ccggagtcaa gggcctatc gggcaggagc agctgagcgg	420
agggcctatg ccggaacact gggaggaagc ctggttgaa gctaccaag gctggcacga	480
tctcgactgc cgtcgcggtg actggcagga ccacctatgg ctccactcgc ccgatggaga	540
cgccgctttg gccgccgccg tagacgctat agaaagagac gctatgggtg gagaagacgt	600
tactaccgct acagaccgcg ttactatagg agacgatggc tggtaaggag aaggcggcgt	660
tccgtctacc gtagaggtgg acgtagagcg cggccctacc gaataagtgc ttttaaccac	720
aaagtaatgc ggagggtggt gattagaggt tgggtggcaa tattacagtg tctaaaagga	780
caggaatcac taagatatag accactgcag tgggacactg aaaaacagtg gagagttaa	840
aaagactatg aggacaacta cggctacttg gtgcagtacg gaggaggttg ggggagtggt	900
gaagtgacat tggagggatt atatcaggaa cacttactct ggagaaactc ttggtcaaag	960
ggaaatgatg gcatggacct agtgagatac tttggctgca tagtatacct gtaccactg	1020
caggaccaag actactggtt ttggtgggat acagacttta aagaactata cgagagagc	1080
atcaaagaat actcccagcc aagtgttatg atgatggcca aacgcactag actagtaata	1140
gctagagaca gagcaccaca cagaagaaga gtaagaaaaa ttttcatacc cccgccaagc	1200
agagacacca cacaatggca atttcagaca gacttctgca aaaggccact attcacatgg	1260
gcggcaggat taatagacat gcagaaacca tttgatgcaa acggagcgtt tagaaacgcc	1320
tgggtggctag aaacaaggaa tgaccagga gaaatgaaat acattgaact atggggaagg	1380
gtgccaccac agggtgacac agaactgcca aacagagtg agtttaagaa gggagataat	1440
aaccctaact ataacataac ggaaggacat gaaaaaata tttaccaat aatcatatac	1500

ES 2 767 781 T3

gttgaccaga aagaccagaa aacaagaaaa aaatactgtg tatgctacaa caaaacttta 1560  
aatagatgga gaaaagccca ggcgagtaca ttagcaatag gagatcttca aggactagta 1620  
ctgctcagc ttatgaatca ggagatgaca tactactgga aatcgggaga gttttcctca 1680  
ccattcctgc aaagatggaa aggaactagg ctaataacca tagacgcaag aaaggcagac 1740  
acagaaaacc caaaagtaag ttcgtgggaa tgggggcaaa actggaacac aagcggaaaca 1800  
gtgctacagg aggtattcaa catttctactg aacaacactc aaataagaca ggatgacttt 1860  
gcaaaattga cactgcctaaa gtcaccacat gacatagact ttggacatca cagcagattt 1920  
ggaccattct gtgttaaaaa cgaaccacta gaattccaac tactgcctcc aacaccaact 1980  
aacctatggt ttcagtacaa atttctcttt cagtttggcg gtgaatacca gccaccaaca 2040  
ggtatccgcg atccctgcat tgatacacca gcctatcctg tgccgcagtc aggaagtgtt 2100  
acacacccca aattcgccgg aaagggcgga atgctcacgg aaacagaccg ttggggatc 2160  
actgctgcct cttccagaac cctcagtgca gatacaccca ccgaagcagc gcaaagtgca 2220  
cttctcagag gggacgcgga aaagaaagga gaggaaaccg aggaaaccgc gtcacgtcc 2280  
agtatcacga gtgcccgaag ctctactgag ggagatggat cgtctgatga tgaagagaca 2340  
atcagacgca gaaggaggac ctggaagcga ctcagacgga tggtcagaca gcagcttgac 2400  
cgacgaatgg accacaagcg acagcgactt cattgatacc cccataagag aaagatgcct 2460  
caataaaaaa caaaaaaac gctaaacagt gtccgcctat tagtgggggg gtccgggggg 2520  
gcttgccccc ccgtaagcgg ggttaccgca ctaactcctt gccaaagtga actcggggac 2580  
gagtgagtgc gggacatccc gtgtaatggc tacataacta cccggctttg cttcgacagt 2640  
ggccgtggct cgaccctcgc acaacactgc aggtaggggg cgcaattggg atcgttagaa 2700  
aactatggcc gagcatgggg ggggctccgc ccccccaac cccccggtg ggggggcaaa 2760  
ggccctcctt acaccccccc atggggggct gccgcccccc aaaccccccg cgtcggatgg 2820  
ggggggctgc gccccccca aacccccctt gccgggggct gtgccccgga ccccc 2875

<210> 11

<211> 2750

<212> ADN

5 <213> Torque teno virus

<400> 11

taatgacagg gttcaccgga aaggctgcaa aattacagct aaaaccacaa tcataacaca 60  
ataaaccaca aactattaca ggaaactgca ataaattaag aaataaatta cacataacca 120  
cctaaccaca ggaaactttg caaaaaaggg gaaataaatc tcattggctg ggccagaagt 180  
cctcattaga ataagaaaag aaccaatcag aaacacttcc tcttttagag tatataagta 240  
agtgcgcaga cgaatggctg agtttatgcc gctggtggta gacacgaaca gagctgagtg 300

ES 2 767 781 T3

tctaaccgcc tgggcgggtg ccggagctcc tgagagcgga gtcaaggggc ctatcgggca 360  
ggcggtaatc cagcggaaact gggccccct ccatggaaga aagatggctg acggtagcgt 420  
actgcgcgca cggattattc tgcgactgta aaaacccgaa aaaacatctt gaaaaatgcc 480  
ttacagacgc tatcgccgac gccgaaggag accgacacgg agatggaggc accggaggtg 540  
gagacgctac tttcgatata ggtatcgacg cgctcctcgc cgccgccgcc caaaggtaag 600  
gagacggagg aggaaagctc cggtcattca atggttccct cctagccgga gaacctgcct 660  
catagagggc ttctggccgt tgagctacgg aacttggttc cgtacctgtc tcactatgag 720  
aaggctaaac ggactgattt tcacgggtgg aggatgtgac tggactcaat ggagtttaca 780  
aaatttattc catgaaaaat taaactggag aaatatatgg acagcttcta atgtaggcat 840  
ggagtttgct agatttttaa gaggaaaatt ttacttcttc agacaccctt ggagaagcta 900  
tatagtaaca tgggaccaag acataccctg taaaccgctc ccatatcaaa acttacaacc 960  
tctattaatg ctctcaaaa aacagcataa attagtcctc tctcaaaaag attgcaacc 1020  
gaacgaaaa caaaaaccag ttacattaaa attcaggcct ccacaaaaat taacatcaca 1080  
gtggagacta agcagagaac tctcaaaaat acccttaata agactaggaa taagtctcat 1140  
agacctgtca gaaccatggt tagaaggctg gggaaatgct ttttacagtg tactaggata 1200  
tgaagctagt aaacacagtg gcagatggtc caactggaca caaatgaaat atttttgat 1260  
ctatgacaca ggcgtgggaa acgcagtcta cgttatttta ctgaaaaaag acgtgagtga 1320  
caatccagga gacatggcta cacagtttgt aacaggctca ggacaacacc cagacgcaat 1380  
agatcatata gaaatggtaa acgaaggatg gccttactgg ctattttttt atggacaatc 1440  
agaacaagat ataaaaaac tagcacatga ccaagatata gtcagagaat atgccagaga 1500  
ccctaaatca aaaaaattaa aaataggagt cataggatgg gccagcagta actacacaac 1560  
agcagggagc aacaaaaaca gtgtacttca aacgccagaa gcaatacaag gtggatatgt 1620  
agcttatgca ggatccagaa taccaggcgc aggatctatc acaaatttat ttcaaatggg 1680  
atggccagga gatcaaaact ggccaccac aaaccaagac caaccaatt ttaactgggg 1740  
actcagagga ctttgtgtat taagagataa catgaaacta ggagcacaag agctagacga 1800  
tgaatgcaca atgctctcct tatttggacc atttgttgaa aaagcaaca cagcttttgc 1860  
tacaacgac ccaaaatatt ttaggcctga actaaaggac tacaacgtag taatgaaata 1920  
tgcttttaa tttcagtggtg gaggacatgg caccgaaaga tttaaaaaa ccatcggaga 1980  
tcccagcacc ataccatgct ccttgaacc cggggaacgg taccaccacg ggtacaaga 2040  
ccccccaag gtacaaaaa cagtcctcaa cccttgggac tatgactgtg acgggattgt 2100  
tagaacagat actctcaaaa gacttctcga actccccaca gagacggagg agacggagaa 2160  
ggcgtacca ctcttggac aaaaaacaga gaaagacca ttatcagact ccgacgaaga 2220

ES 2 767 781 T3

gagcgttatac tcaagcacga gcagtggatc ctctcaagaa gaagagacgc agagacgaaa 2280  
gcaccacaag ccaagcaagc gacgactcct caagcacctc cagcgggtgg taaagaggat 2340  
gaaaacactg tgatagataa atacagaaac ctagcagacc cctcactcaa tgtcacagga 2400  
cacatggaaa aattcatgca actacacata caaacatac aagaataag agctaaaaat 2460  
gctaaaaaat ccctcaataa actttacttt tctgattaat agcggcctcc tgtgtccaat 2520  
ctatttttcc tacaccctt caaaatggcg ggaggaacac aaaatggcgg agggactaag 2580  
gggggggcaa gcccccccc ggggggtgag ggggggtttc cccccctccc cccggtgcag 2640  
ggggcggagc ccccgacccc cccatgcggg ggctccgccc cctgcacccc cgggaggggg 2700  
ggaaaccccc cctcaacccc ccgcgggggg caagcccccc tgcaccccc 2750

<210> 12

<211> 2803

<212> ADN

5 <213> Torque teno virus

<400> 12

tcatgacagg gttcaccgga agggctgcaa aattacagct aaaaccacaa gtctaacaca 60  
ataaaccaca aagtattaca ggaaactgca ataaatthag aaatagatta cacataacca 120  
ccaaaccaca ggaaacctac acataaccac caaacacag gaaacataac caccaaacca 180  
caggaaactg tgcaaaaaag gggaaataaa ttctattggc tgggcctgaa gtcctcatta 240  
gaataataaa agaaccaatc agaagaactt cctcttttag agtatataag taagtgcgca 300  
gacgaatggc tgagtttatg ccgctggtgg tagacacgaa cagagctgag tgtctaaccg 360  
cctgggcggg tgccggagct cctgagagcg gagtcaaggg gcttatcggg caggcggtaa 420  
tccagcggaa ccgggcccc ctcgatggaa gaaagatggc tgacggtagc gtactgcgcc 480  
cacggattat tctgcggtatg taaagaccgg aaaaaacacc ttgaaaaatg ccttacagac 540  
gctatcgcag acgccgaagg agaccgacac ggagatggag gcaccggagg tggagacgct 600  
tctttcgata tcggtatcga cgcgctcctc gccgcccgg caciaaggtg aggagacgga 660  
ggagaaaagc tccggtcata caatggttcc ctctagccg gaggacctgc ctcatagagg 720  
gcttctggcc gttgagctac ggacactggt tccgtacctg tctccctatg agaaggctga 780  
acggactcat tttcacgggt ggcggttggt actggacaca gtggagtta caaaacttat 840  
accatgaaaa acttaactgg agaaatatat ggacagcttc taatgttggc atggaatttg 900  
ctagattttt aagaggaaaa ttttacttct tcagacaccc ctggagaagc tatattatta 960  
cttgggacca agacattcct tgcaaacctt taccatacca aaacttacat ccactactta 1020  
tgctatataa aaaacaacat aaactgttac tatctcaaaa agactgtaat ccaaacagaa 1080  
gacaaaaacc agtaacttta aaaataagac ctccacaaa attaacatca cagtggagat 1140

ES 2 767 781 T3

taagcagaga actagcaaaa atgccacttg tcagactagg agtcagtcta atagacctct 1200  
 cagaacctatg gttagaaggc tggggaaatg ctttttacag cgtactggga tatgaagcta 1260  
 gtaaacactc agggagatgg tcaaaactgga cacaaataaa atacttctgg atatatgaca 1320  
 caggagttagg aaatgcagtt tatgtcattt tattaaaaca agaggtggat gataatccag 1380  
 gggcaatggc aacaaaatth gtaactggac caggacaaca cccagatgcc atagacagga 1440  
 tcgaacaaat aaatgaagga tggccttact ggcttttctt ttacggacag tcagaacaag 1500  
 acataaaaaa attagcacac gatcaagaaa tagcaaggga atatgcaaac aatccaaaat 1560  
 ctaaaaaaatt aaaaatagga gtgataggat gggctagcag taactttaca acagcaggca 1620  
 gctcacaaaa tcaaacacca caaacaccag aagccataca aggaggatac gtagcatatg 1680  
 caggctcaaa aatacaagga gcaggagcaa ttacaaactt atacacagat gcatggccgg 1740  
 gagaccaaaa ttggccacct ctaaataagag aacaacaaaa ctttaactgg ggcttaagag 1800  
 gactctgtat aatgagagat aatatgaaac tgggagctca agaactagat gatgaatgta 1860  
 caatgctcac actttttgga ctttttggg aaaaagcaaa cacagctttt gctacaaatg 1920  
 accctaaata cttcagacca gaactcaaag actataacat agtaatgaaa tatgccttta 1980  
 aatttcagtg gggaggccac ggaaccgaaa gattcaaaac aaccatcgga gatcccagca 2040  
 ccataccatg tccttttgaa cccggggaac ggtaccacca cggggtacaa gaccccgcca 2100  
 aggtacaaaa cacagtcctc aacccttggg actatgactg tgacgggatt gttagaacag 2160  
 atactctcaa aagacttctc gaactcccca cagagacgga ggagacggag aaggcgtacc 2220  
 cactccttgg acaaaaaaca gagaaagagc cattatcaga ctccgacgaa gagagcgta 2280  
 tctcaagcac gagcagtgga tcctctcaag aagaagagac gcagagaaga agacagcaca 2340  
 agccaagcaa gcgacgactc ctcaagcacc tccagcgggt ggtaaagaga atgaagacac 2400  
 tgtgatagat aaatatagaa acctagcaga cccctcactc aatgtcacag gacacatgga 2460  
 aaaatcatg caactgcaca taaaaaacgt acaagaata agagctaaaa atgctaaaaa 2520  
 atccctcaat aaactttact tttctgatta ataccggcct cctgtgtcca atctatttt 2580  
 cctacacccc ttcaaaatgg cgggcgggac acaaaatggc ggaggaaact aagggggggg 2640  
 caagcccccc cccgggggtt gagggggggt ttccccctt cccccgggtg cagggggcgg 2700  
 agcccccgca cccccctgc gggggctccg ccccctgcac ccccgggag gggggaaacc 2760  
 cccctcaac cccccgagg gggcaagccc ccctgcaccc ccc 2803

<210> 13

<211> 635

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 13

ES 2 767 781 T3

Met Arg Phe Arg Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg  
 1 5 10 15

Lys Arg Arg Gly Gly Trp Arg Arg Arg Phe Arg Ile Arg Arg Arg Arg  
 20 25 30

Pro Trp Arg Arg Trp Arg Val Arg Arg Trp Arg Arg Ser Val Phe Arg  
 35 40 45

Arg Gly Gly Arg Arg Ala Arg Pro Tyr Arg Ile Ser Ala Trp Asn Pro  
 50 55 60

Lys Val Leu Arg Asn Cys Arg Ile Thr Gly Trp Trp Pro Val Ile Gln  
 65 70 75 80

Cys Met Asp Gly Met Glu Trp Ile Lys Tyr Lys Pro Met Asp Leu Arg  
 85 90 95

Val Glu Ala Asn Trp Ile Phe Asn Lys Gln Asp Ser Lys Ile Glu Thr  
 100 105 110

Glu Gln Met Gly Tyr Leu Met Gln Tyr Gly Gly Gly Trp Ser Ser Gly  
 115 120 125

Val Ile Ser Leu Glu Gly Leu Phe Asn Glu Asn Arg Leu Trp Arg Asn  
 130 135 140

Ile Trp Ser Lys Ser Asn Asp Gly Met Asp Leu Val Arg Tyr Phe Gly  
 145 150 155 160

Cys Arg Ile Arg Leu Tyr Pro Thr Glu Asn Gln Asp Tyr Leu Phe Trp  
 165 170 175

Tyr Asp Thr Glu Phe Asp Glu Gln Gln Arg Arg Met Leu Asp Glu Tyr  
 180 185 190

Thr Gln Pro Ser Val Met Leu Gln Ala Lys Asn Ser Arg Leu Ile Val  
 195 200 205

Cys Lys Gln Lys Met Pro Ile Arg Arg Arg Val Lys Ser Ile Phe Ile  
 210 215 220

Pro Pro Pro Ala Gln Leu Thr Thr Gln Trp Lys Phe Gln Gln Glu Leu  
 225 230 235 240

Cys Gln Phe Pro Leu Phe Asn Trp Ala Cys Ile Cys Ile Asp Met Asp

ES 2 767 781 T3

				245						250						255
Thr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Asn	Gly	Ala	Trp	Arg	Asn	Ala	Trp	Trp	Leu	Met	
			260					265					270			
Arg	Arg	Leu	Gln	Asn	Gly	Asn	Met	Glu	Tyr	Ile	Glu	Arg	Trp	Gly	Arg	
		275					280					285				
Ile	Pro	Met	Thr	Gly	Asp	Thr	Glu	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	
	290					295					300					
Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Lys	Asn	Phe	Lys	Pro	Thr	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile	
305					310					315					320	
Tyr	Pro	Ile	Val	Ala	Val	Cys	Leu	Val	Glu	Gly	Asn	Lys	Arg	Val	Val	
				325					330					335		
Lys	Trp	Ala	Thr	Val	His	Asn	Gly	Pro	Ile	Asp	Arg	Trp	Arg	Lys	Lys	
			340					345					350			
Gln	Thr	Gly	Thr	Leu	Lys	Leu	Ser	Asn	Leu	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Arg	
		355					360					365				
Val	Cys	Ser	Glu	Ser	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Trp	Thr	Gly	Ser	Glu	Phe	
	370					375					380					
Thr	Gly	Ala	Phe	Gln	Gln	Asp	Trp	Trp	Pro	Val	Gly	Gly	Thr	Glu	Tyr	
385					390					395					400	
Pro	Leu	Cys	Thr	Ile	Lys	Met	Asp	Pro	Glu	Tyr	Glu	Asn	Pro	Thr	Val	
				405					410					415		
Glu	Val	Trp	Ser	Trp	Lys	Ala	Asn	Ile	Pro	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Lys	
			420					425					430			
Asp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ser	Thr	Gly	Gln	Gln	Trp	Lys	Asp	Thr	Asp	Phe	
		435					440					445				
Ala	Arg	Leu	Gln	Leu	Pro	Arg	Ser	Ser	His	Asn	Val	Asp	Phe	Gly	His	
	450					455					460					
Lys	Ala	Arg	Phe	Gly	Pro	Phe	Cys	Val	Lys	Lys	Pro	Pro	Val	Glu	Phe	
465					470					475					480	
Arg	Asp	Thr	Ala	Pro	Asn	Pro	Leu	Asn	Ile	Trp	Val	Lys	Tyr	Thr	Phe	
				485					490					495		

ES 2 767 781 T3

Tyr Phe Gln Phe Gly Gly Met Tyr Gln Pro Pro Thr Gly Ile Gln Asp  
500 505 510

Pro Cys Thr Ser Asn Pro Thr Tyr Pro Val Arg Met Val Gly Ala Val  
515 520 525

Thr His Pro Lys Tyr Ala Gly Gln Gly Gly Ile Thr Thr Gln Ile Gly  
530 535 540

Asp Gln Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ile Arg Ala Ile Ser Ala Ala Pro  
545 550 555 560

Pro Asp Thr Tyr Thr Gln Ser Ala Phe Leu Lys Ala Pro Glu Thr Glu  
565 570 575

Lys Glu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Thr Ser Phe Thr Ser Ala Glu Ser  
580 585 590

Ser Ser Glu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Asp Gln Ala Glu Arg Arg Ala  
595 600 605

Ala Arg Lys Arg Val Ile Lys Leu Leu Leu Lys Arg Leu Ala Asp Arg  
610 615 620

Pro Val Asp Asn Lys Arg Arg Arg Phe Ser Glu  
625 630 635

<210> 14

<211> 639

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 14

Met Ala Pro Thr Arg Arg Trp Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Lys Arg Arg Tyr Gly Trp Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr  
20 25 30

Arg Pro Arg Tyr Tyr Arg Arg Arg Trp Leu Val Arg Arg Arg Arg Arg  
35 40 45

Ser Val Tyr Arg Arg Gly Gly Arg Arg Ala Arg Pro Tyr Arg Ile Ser  
50 55 60

Ala Phe Asn Pro Lys Val Met Arg Arg Val Val Ile Arg Gly Trp Trp  
65 70 75 80

ES 2 767 781 T3

Pro Ile Leu Gln Cys Leu Lys Gly Gln Glu Ser Leu Arg Tyr Arg Pro  
85 90 95

Leu Gln Trp Asp Thr Glu Lys Gln Trp Arg Val Lys Lys Asp Tyr Glu  
100 105 110

Asp Asn Tyr Gly Tyr Leu Val Gln Tyr Gly Gly Gly Trp Gly Ser Gly  
115 120 125

Glu Val Thr Leu Glu Gly Leu Tyr Gln Glu His Leu Leu Trp Arg Asn  
130 135 140

Ser Trp Ser Lys Gly Asn Asp Gly Met Asp Leu Val Arg Tyr Phe Gly  
145 150 155 160

Cys Ile Val Tyr Leu Tyr Pro Leu Gln Asp Gln Asp Tyr Trp Phe Trp  
165 170 175

Trp Asp Thr Asp Phe Lys Glu Leu Tyr Ala Glu Ser Ile Lys Glu Tyr  
180 185 190

Ser Gln Pro Ser Val Met Met Met Ala Lys Arg Thr Arg Leu Val Ile  
195 200 205

Ala Arg Asp Arg Ala Pro His Arg Arg Arg Val Arg Lys Ile Phe Ile  
210 215 220

Pro Pro Pro Ser Arg Asp Thr Thr Gln Trp Gln Phe Gln Thr Asp Phe  
225 230 235 240

Cys Lys Arg Pro Leu Phe Thr Trp Ala Ala Gly Leu Ile Asp Met Gln  
245 250 255

Lys Pro Phe Asp Ala Asn Gly Ala Phe Arg Asn Ala Trp Trp Leu Glu  
260 265 270

Thr Arg Asn Asp Gln Gly Glu Met Lys Tyr Ile Glu Leu Trp Gly Arg  
275 280 285

Val Pro Pro Gln Gly Asp Thr Glu Leu Pro Lys Gln Ser Glu Phe Lys  
290 295 300

Lys Gly Asp Asn Asn Pro Asn Tyr Asn Ile Thr Glu Gly His Glu Lys  
305 310 315 320

Asn Ile Tyr Pro Ile Ile Ile Tyr Val Asp Gln Lys Asp Gln Lys Thr  
325 330 335

ES 2 767 781 T3

Arg Lys Lys Tyr Cys Val Cys Tyr Asn Lys Thr Leu Asn Arg Trp Arg  
 340 345 350

Lys Ala Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ile Gly Asp Leu Gln Gly Leu Val  
 355 360 365

Leu Arg Gln Leu Met Asn Gln Glu Met Thr Tyr Tyr Trp Lys Ser Gly  
 370 375 380

Glu Phe Ser Ser Pro Phe Leu Gln Arg Trp Lys Gly Thr Arg Leu Ile  
 385 390 400

Thr Ile Asp Ala Arg Lys Ala Asp Thr Glu Asn Pro Lys Val Ser Ser  
 405 410 415

Trp Glu Trp Gly Gln Asn Trp Asn Thr Ser Gly Thr Val Leu Gln Glu  
 420 425 430

Val Phe Asn Ile Ser Leu Asn Asn Thr Gln Ile Arg Gln Asp Asp Phe  
 435 440 445

Ala Lys Leu Thr Leu Pro Lys Ser Pro His Asp Ile Asp Phe Gly His  
 450 455 460

His Ser Arg Phe Gly Pro Phe Cys Val Lys Asn Glu Pro Leu Glu Phe  
 465 470 475 480

Gln Leu Leu Pro Pro Thr Pro Thr Asn Leu Trp Phe Gln Tyr Lys Phe  
 485 490 495

Leu Phe Gln Phe Gly Gly Glu Tyr Gln Pro Pro Thr Gly Ile Arg Asp  
 500 505 510

Pro Cys Ile Asp Thr Pro Ala Tyr Pro Val Pro Gln Ser Gly Ser Val  
 515 520 525

Thr His Pro Lys Phe Ala Gly Lys Gly Gly Met Leu Thr Glu Thr Asp  
 530 535 540

Arg Trp Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ser Arg Thr Leu Ser Ala Asp Thr  
 545 550 555 560

Pro Thr Glu Ala Ala Gln Ser Ala Leu Leu Arg Gly Asp Ala Glu Lys  
 565 570 575

Lys Gly Glu Glu Thr Glu Glu Thr Ala Ser Ser Ser Ser Ile Thr Ser  
 580 585 590

Ala Glu Ser Ser Thr Glu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Asp Glu Glu Thr  
 595 600 605

Ile Arg Arg Arg Arg Arg Thr Trp Lys Arg Leu Arg Arg Met Val Arg  
 610 615 620

Gln Gln Leu Asp Arg Arg Met Asp His Lys Arg Gln Arg Leu His  
 625 630 635

ES 2 767 781 T3

<210> 15

<211> 625

<212> PRT

<213> Torque teno virus

5 <400> 15

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg  
1 5 10 15

Trp Arg His Arg Arg Trp Arg Arg Tyr Phe Arg Tyr Arg Tyr Arg Arg  
20 25 30

Ala Pro Arg Arg Arg Arg Pro Lys Val Arg Arg Arg Arg Arg Lys Ala  
35 40 45

Pro Val Ile Gln Trp Phe Pro Pro Ser Arg Arg Thr Cys Leu Ile Glu  
50 55 60

Gly Phe Trp Pro Leu Ser Tyr Gly His Trp Phe Arg Thr Cys Leu Pro  
65 70 75 80

Met Arg Arg Leu Asn Gly Leu Ile Phe Thr Gly Gly Gly Cys Asp Trp  
85 90 95

Thr Gln Trp Ser Leu Gln Asn Leu Phe His Glu Lys Leu Asn Trp Arg  
100 105 110

Asn Ile Trp Thr Ala Ser Asn Val Gly Met Glu Phe Ala Arg Phe Leu  
115 120 125

Arg Gly Lys Phe Tyr Phe Phe Arg His Pro Trp Arg Ser Tyr Ile Val  
130 135 140

Thr Trp Asp Gln Asp Ile Pro Cys Lys Pro Leu Pro Tyr Gln Asn Leu  
145 150 155 160

Gln Pro Leu Leu Met Leu Leu Lys Lys Gln His Lys Leu Val Leu Ser  
165 170 175

ES 2 767 781 T3

Gln Lys Asp Cys Asn Pro Asn Arg Lys Gln Lys Pro Val Thr Leu Lys  
 180 185 190

Phe Arg Pro Pro Pro Lys Leu Thr Ser Gln Trp Arg Leu Ser Arg Glu  
 195 200 205

Leu Ser Lys Ile Pro Leu Ile Arg Leu Gly Ile Ser Leu Ile Asp Leu  
 210 215 220

Ser Glu Pro Trp Leu Glu Gly Trp Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Val Leu  
 225 230 235 240

Gly Tyr Glu Ala Ser Lys His Ser Gly Arg Trp Ser Asn Trp Thr Gln  
 245 250 255

Met Lys Tyr Phe Trp Ile Tyr Asp Thr Gly Val Gly Asn Ala Val Tyr  
 260 265 270

Val Ile Leu Leu Lys Lys Asp Val Ser Asp Asn Pro Gly Asp Met Ala  
 275 280 285

Thr Gln Phe Val Thr Gly Ser Gly Gln His Pro Asp Ala Ile Asp His  
 290 295 300

Ile Glu Met Val Asn Glu Gly Trp Pro Tyr Trp Leu Phe Phe Tyr Gly  
 305 310 315 320

Gln Ser Glu Gln Asp Ile Lys Lys Leu Ala His Asp Gln Asp Ile Val  
 325 330 335

Arg Glu Tyr Ala Arg Asp Pro Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ile Gly Val  
 340 345 350

Ile Gly Trp Ala Ser Ser Asn Tyr Thr Thr Ala Gly Ser Asn Gln Asn  
 355 360 365

Ser Val Leu Gln Thr Pro Glu Ala Ile Gln Gly Gly Tyr Val Ala Tyr  
 370 375 380

Ala Gly Ser Arg Ile Pro Gly Ala Gly Ser Ile Thr Asn Leu Phe Gln  
 385 390 395 400

Met Gly Trp Pro Gly Asp Gln Asn Trp Pro Pro Thr Asn Gln Asp Gln  
 405 410 415

Thr Asn Phe Asn Trp Gly Leu Arg Gly Leu Cys Val Leu Arg Asp Asn

ES 2 767 781 T3

420

425

430

Met Lys Leu Gly Ala Gln Glu Leu Asp Asp Glu Cys Thr Met Leu Ser  
435 440 445

Leu Phe Gly Pro Phe Val Glu Lys Ala Asn Thr Ala Phe Ala Thr Asn  
450 455 460

Asp Pro Lys Tyr Phe Arg Pro Glu Leu Lys Asp Tyr Asn Val Val Met  
465 470 475 480

Lys Tyr Ala Phe Lys Phe Gln Trp Gly Gly His Gly Thr Glu Arg Phe  
485 490 495

Lys Thr Thr Ile Gly Asp Pro Ser Thr Ile Pro Cys Pro Phe Glu Pro  
500 505 510

Gly Glu Arg Tyr His His Gly Val Gln Asp Pro Ala Lys Val Gln Asn  
515 520 525

Thr Val Leu Asn Pro Trp Asp Tyr Asp Cys Asp Gly Ile Val Arg Thr  
530 535 540

Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu Thr  
545 550 555 560

Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro Leu  
565 570 575

Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly Ser  
580 585 590

Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Lys His His Lys Pro Ser Lys  
595 600 605

Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys Thr  
610 615 620

Leu  
625

<210> 16

<211> 625

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 16

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg

ES 2 767 781 T3

1		5		10		15													
Trp	Arg	His	Arg	Arg	Trp	Arg	Arg	Phe	Phe	Arg	Tyr	Arg	Tyr	Arg	Arg				
		20						25					30						
Ala	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Val	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Ala				
		35					40						45						
Pro	Val	Ile	Gln	Trp	Phe	Pro	Pro	Ser	Arg	Arg	Thr	Cys	Leu	Ile	Glu				
	50					55					60								
Gly	Phe	Trp	Pro	Leu	Ser	Tyr	Gly	His	Trp	Phe	Arg	Thr	Cys	Leu	Pro				
65					70					75					80				
Met	Arg	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Ile	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Asp	Trp				
				85					90					95					
Thr	Gln	Trp	Ser	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr	His	Glu	Lys	Leu	Asn	Trp	Arg				
			100					105						110					
Asn	Ile	Trp	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Gly	Met	Glu	Phe	Ala	Arg	Phe	Leu				
		115					120					125							
Arg	Gly	Lys	Phe	Tyr	Phe	Phe	Arg	His	Pro	Trp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Ile				
	130					135					140								
Thr	Trp	Asp	Gln	Asp	Ile	Pro	Cys	Lys	Pro	Leu	Pro	Tyr	Gln	Asn	Leu				
145					150					155					160				
His	Pro	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Lys	Lys	Gln	His	Lys	Leu	Val	Leu	Ser				
				165					170						175				
Gln	Lys	Asp	Cys	Asn	Pro	Asn	Arg	Arg	Gln	Lys	Pro	Val	Thr	Leu	Lys				
			180					185						190					
Ile	Arg	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Thr	Ser	Gln	Trp	Arg	Leu	Ser	Arg	Glu				
		195					200						205						
Leu	Ala	Lys	Met	Pro	Leu	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu				
	210					215					220								
Ser	Glu	Pro	Trp	Leu	Glu	Gly	Trp	Gly	Asn	Ala	Phe	Tyr	Ser	Val	Leu				
225					230					235					240				
Gly	Tyr	Glu	Ala	Ser	Lys	His	Ser	Gly	Arg	Trp	Ser	Asn	Trp	Thr	Gln				
				245					250						255				

ES 2 767 781 T3

Ile Lys Tyr Phe Trp Ile Tyr Asp Thr Gly Val Gly Asn Ala Val Tyr  
 260 265 270

Val Ile Leu Leu Lys Gln Glu Val Asp Asp Asn Pro Gly Ala Met Ala  
 275 280 285

Thr Lys Phe Val Thr Gly Pro Gly Gln His Pro Asp Ala Ile Asp Arg  
 290 295 300

Ile Glu Gln Ile Asn Glu Gly Trp Pro Tyr Trp Leu Phe Phe Tyr Gly  
 305 310 315 320

Gln Ser Glu Gln Asp Ile Lys Lys Leu Ala His Asp Gln Glu Ile Ala  
 325 330 335

Arg Glu Tyr Ala Asn Asn Pro Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ile Gly Val  
 340 345 350

Ile Gly Trp Ala Ser Ser Asn Phe Thr Thr Ala Gly Ser Ser Gln Asn  
 355 360 365

Gln Thr Pro Gln Thr Pro Glu Ala Ile Gln Gly Gly Tyr Val Ala Tyr  
 370 375 380

Ala Gly Ser Lys Ile Gln Gly Ala Gly Ala Ile Thr Asn Leu Tyr Thr  
 385 390 395 400

Asp Ala Trp Pro Gly Asp Gln Asn Trp Pro Pro Leu Asn Arg Glu Gln  
 405 410 415

Thr Asn Phe Asn Trp Gly Leu Arg Gly Leu Cys Ile Met Arg Asp Asn  
 420 425 430

Met Lys Leu Gly Ala Gln Glu Leu Asp Asp Glu Cys Thr Met Leu Thr  
 435 440 445

Leu Phe Gly Pro Phe Val Glu Lys Ala Asn Thr Ala Phe Ala Thr Asn  
 450 455 460

Asp Pro Lys Tyr Phe Arg Pro Glu Leu Lys Asp Tyr Asn Ile Val Met  
 465 470 475 480

Lys Tyr Ala Phe Lys Phe Gln Trp Gly Gly His Gly Thr Glu Arg Phe  
 485 490 495

Lys Thr Thr Ile Gly Asp Pro Ser Thr Ile Pro Cys Pro Phe Glu Pro  
 500 505 510

ES 2 767 781 T3

Gly Glu Arg Tyr His His Gly Val Gln Asp Pro Ala Lys Val Gln Asn  
 515 520 525

Thr Val Leu Asn Pro Trp Asp Tyr Asp Cys Asp Gly Ile Val Arg Thr  
 530 535 540

Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu Thr  
 545 550 555 560

Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro Leu  
 565 570 575

Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly Ser  
 580 585 590

Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Arg Gln His Lys Pro Ser Lys  
 595 600 605

Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys Thr  
 610 615 620

Leu  
 625

<210> 17

<211> 73

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 17

Met Lys Glu Lys Asp Tyr Trp Glu Glu Ala Trp Leu Thr Ser Cys Thr  
 1 5 10 15

Ser Ile His Asp His His Cys Asn Cys Gly Ser Trp Arg Asp His Leu  
 20 25 30

Trp Thr Leu Cys Ala Leu Asp Asp Ala Asp Leu Ala Ala Ala Asp  
 35 40 45

Ile Ile Glu Arg Glu Glu Ala Asp Gly Gly Glu Asp Phe Gly Phe Val  
 50 55 60

Asp Gly Asp Pro Gly Asp Ala Gly Gly  
 65 70

<210> 18

<211> 72

10 <212> PRT

<213> Torque teno virus

<400> 18

ES 2 767 781 T3

Met Pro Glu His Trp Glu Glu Ala Trp Leu Glu Ala Thr Lys Gly Trp  
1 5 10 15

His Asp Leu Asp Cys Arg Cys Gly Asn Trp Gln Asp His Leu Trp Leu  
20 25 30

Leu Leu Ala Asp Gly Asp Ala Ala Leu Ala Ala Val Asp Ala Ile  
35 40 45

Glu Arg Asp Ala Met Gly Gly Glu Asp Val Thr Thr Ala Thr Asp Arg  
50 55 60

Val Thr Ile Gly Asp Asp Gly Trp  
65 70

<210> 19

<211> 68

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 19

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe  
1 5 10 15

Cys Asp Cys Lys Asn Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp  
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly  
35 40 45

Gly Gly Asp Ala Thr Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala  
50 55 60

Ala Ala Gln Arg  
65

<210> 20

<211> 68

10 <212> PRT

<213> Torque teno virus

<400> 20

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe  
1 5 10 15

Cys Gly Cys Lys Asp Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp

ES 2 767 781 T3

20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly  
35 40 45

Gly Gly Asp Ala Ser Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala  
50 55 60

Ala Ala Gln Arg  
65

<210> 21

<211> 174

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 21

Met Arg Phe Arg Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg  
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gly Gly Trp Arg Arg Arg Phe Arg Ile Arg Arg Arg Arg  
20 25 30

Pro Trp Arg Arg Trp Arg Phe Gly Gly Met Tyr Gln Pro Pro Thr Gly  
35 40 45

Ile Gln Asp Pro Cys Thr Ser Asn Pro Thr Tyr Pro Val Arg Met Val  
50 55 60

Gly Ala Val Thr His Pro Lys Tyr Ala Gly Gln Gly Gly Ile Thr Thr  
65 70 75 80

Gln Ile Gly Asp Gln Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ile Arg Ala Ile Ser  
85 90 95

Ala Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Thr Gln Ser Ala Phe Leu Lys Ala Pro  
100 105 110

Glu Thr Glu Lys Glu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Thr Ser Phe Thr Ser  
115 120 125

Ala Glu Ser Ser Ser Glu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Asp Gln Ala Glu  
130 135 140

Arg Arg Ala Ala Arg Lys Arg Val Ile Lys Leu Leu Leu Lys Arg Leu  
145 150 155 160

Ala Asp Arg Pro Val Asp Asn Lys Arg Arg Arg Phe Ser Glu

165 170

<210> 22

10 <211> 182

ES 2 767 781 T3

<212> PRT

<213> Torque teno virus

<400> 22

Met Ala Pro Thr Arg Arg Trp Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Lys Arg Arg Tyr Gly Trp Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr  
20 25 30

Arg Pro Arg Tyr Tyr Arg Arg Arg Trp Leu Phe Gly Gly Glu Tyr Gln  
35 40 45

Pro Pro Thr Gly Ile Arg Asp Pro Cys Ile Asp Thr Pro Ala Tyr Pro  
50 55 60

Val Pro Gln Ser Gly Ser Val Thr His Pro Lys Phe Ala Gly Lys Gly  
65 70 75 80

Gly Met Leu Thr Glu Thr Asp Arg Trp Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ser  
85 90 95

Arg Thr Leu Ser Ala Asp Thr Pro Thr Glu Ala Ala Gln Ser Ala Leu  
100 105 110

Leu Arg Gly Asp Ala Glu Lys Lys Gly Glu Glu Thr Glu Glu Thr Ala  
115 120 125

Ser Ser Ser Ser Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ser Thr Glu Gly Asp Gly  
130 135 140

Ser Ser Asp Asp Glu Glu Thr Ile Arg Arg Arg Arg Arg Thr Trp Lys  
145 150 155 160

Arg Leu Arg Arg Met Val Arg Gln Gln Leu Asp Arg Arg Met Asp His  
165 170 175

Lys Arg Gln Arg Leu His  
180

5 <210> 23

<211> 178

<212> PRT

<213> Torque teno virus

<400> 23

ES 2 767 781 T3

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg  
1 5 10 15

Trp Arg His Arg Arg Trp Arg Arg Tyr Phe Arg Tyr Arg Tyr Arg Arg  
20 25 30

Ala Pro Arg Arg Arg Arg Pro Lys Trp Gly Gly His Gly Thr Glu Arg  
35 40 45

Phe Lys Thr Thr Ile Gly Asp Pro Ser Thr Ile Pro Cys Pro Phe Glu  
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Tyr His His Gly Val Gln Asp Pro Ala Lys Val Gln  
65 70 75 80

Asn Thr Val Leu Asn Pro Trp Asp Tyr Asp Cys Asp Gly Ile Val Arg  
85 90 95

Thr Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu  
100 105 110

Thr Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro  
115 120 125

Leu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly  
130 135 140

Ser Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Lys His His Lys Pro Ser  
145 150 155 160

Lys Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys  
165 170 175

Thr Leu

<210> 24

<211> 178

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 24

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg  
1 5 10 15

Trp Arg His Arg Arg Trp Arg Arg Phe Phe Arg Tyr Arg Tyr Arg Arg  
20 25 30

ES 2 767 781 T3

Ala Pro Arg Arg Arg Arg Thr Lys Trp Gly Gly His Gly Thr Glu Arg  
 35 40 45

Phe Lys Thr Thr Ile Gly Asp Pro Ser Thr Ile Pro Cys Pro Phe Glu  
 50 55 60

Pro Gly Glu Arg Tyr His His Gly Val Gln Asp Pro Ala Lys Val Gln  
 65 70 75 80

Asn Thr Val Leu Asn Pro Trp Asp Tyr Asp Cys Asp Gly Ile Val Arg  
 85 90 95

Thr Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu  
 100 105 110

Thr Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro  
 115 120 125

Leu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly  
 130 135 140

Ser Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Arg Gln His Lys Pro Ser  
 145 150 155 160

Lys Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys  
 165 170 175

Thr Leu

<210> 25

<211> 224

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 25

Met Lys Glu Lys Asp Tyr Trp Glu Glu Ala Trp Leu Thr Ser Cys Thr  
 1 5 10 15

Ser Ile His Asp His His Cys Asn Cys Gly Ser Trp Arg Asp His Leu  
 20 25 30

Trp Thr Leu Cys Ala Leu Asp Asp Ala Asp Leu Ala Ala Ala Asp  
 35 40 45

Ile Ile Glu Arg Glu Glu Ala Asp Gly Gly Glu Asp Phe Gly Phe Val  
 50 55 60

ES 2 767 781 T3

Asp Gly Asp Pro Gly Asp Ala Gly Gly Ser Ala Ala Cys Thr Ser Leu  
65 70 75 80

Pro Pro Glu Ser Lys Ile Pro Ala Leu Leu Thr Arg Pro Ile Leu Ser  
85 90 95

Glu Trp Ser Glu Gln Leu His Thr Pro Asn Thr Pro Gly Lys Ala Glu  
100 105 110

Ser Arg Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Ser Pro Leu Pro Leu Ser Val  
115 120 125

Pro Ser Val Gln Leu His Gln Ile Pro Thr Arg Ser Arg Arg Ser Ser  
130 135 140

Lys Pro Arg Lys Pro Arg Lys Lys Arg Lys Glu Arg Val Arg Pro Val  
145 150 155 160

Ser Arg Val Pro Lys Ala Leu Leu Arg Glu Met Asp Arg Leu Met Thr  
165 170 175

Lys Gln Arg Asp Ala Leu Pro Glu Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Phe Ser  
180 185 190

Ser Asp Ser Leu Thr Asp Pro Trp Thr Thr Ser Asp Asp Asp Phe Gln  
195 200 205

Ser Asp Pro Asp Pro Leu Thr Asn Lys Arg Lys Lys Arg Leu Gln Phe  
210 215 220

<210> 26

<211> 228

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 26

Met Pro Glu His Trp Glu Glu Ala Trp Leu Glu Ala Thr Lys Gly Trp  
1 5 10 15

His Asp Leu Asp Cys Arg Cys Gly Asn Trp Gln Asp His Leu Trp Leu  
20 25 30

Leu Leu Ala Asp Gly Asp Ala Ala Leu Ala Ala Ala Val Asp Ala Ile  
35 40 45

Glu Arg Asp Ala Met Gly Gly Glu Asp Val Thr Thr Ala Thr Asp Arg  
50 55 60

ES 2 767 781 T3

Val Thr Ile Gly Asp Asp Gly Cys Leu Ala Val Asn Thr Ser His Gln  
65 70 75 80

Gln Val Ser Ala Ile Pro Ala Leu Ile His Gln Pro Ile Leu Cys Arg  
85 90 95

Ser Gln Glu Val Leu His Thr Pro Asn Ser Pro Glu Arg Ala Glu Cys  
100 105 110

Ser Arg Lys Gln Thr Val Gly Val Ser Leu Leu Pro Leu Pro Glu Pro  
115 120 125

Ser Val Gln Ile His Pro Pro Lys Gln Arg Lys Val His Phe Ser Glu  
130 135 140

Gly Thr Arg Lys Arg Lys Glu Arg Lys Pro Arg Lys Pro Arg His Arg  
145 150 155 160

Pro Val Ser Arg Val Pro Lys Ala Leu Leu Arg Glu Met Asp Arg Leu  
165 170 175

Met Met Lys Arg Gln Ser Asp Ala Glu Gly Gly Pro Gly Ser Asp Ser  
180 185 190

Asp Gly Trp Ser Asp Ser Ser Leu Thr Asp Glu Trp Thr Thr Ser Asp  
195 200 205

Ser Asp Phe Ile Asp Thr Pro Ile Arg Glu Arg Cys Leu Asn Lys Lys  
210 215 220

Gln Lys Lys Arg  
225

<210> 27

<211> 199

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 27

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe  
1 5 10 15

Cys Asp Cys Lys Asn Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp  
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly  
35 40 45

ES 2 767 781 T3

Gly Gly Asp Ala Thr Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala  
50 55 60

Ala Ala Gln Ser Gly Glu Asp Met Ala Pro Lys Asp Leu Lys Gln Pro  
65 70 75 80

Ser Glu Ile Pro Ala Pro Tyr His Val Pro Leu Asn Pro Gly Asn Gly  
85 90 95

Thr Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Pro Pro Arg Tyr Lys Thr Gln Ser Ser  
100 105 110

Thr Leu Gly Thr Met Thr Val Thr Gly Leu Leu Glu Gln Ile Leu Ser  
115 120 125

Lys Asp Phe Ser Asn Ser Pro Gln Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
130 135 140

Thr His Ser Leu Asp Lys Lys Gln Arg Lys Ser His Tyr Gln Thr Pro  
145 150 155 160

Thr Lys Arg Ala Leu Ser Gln Ala Arg Ala Val Asp Pro Leu Lys Lys  
165 170 175

Lys Arg Arg Arg Asp Glu Ser Thr Thr Ser Gln Ala Ser Asp Asp Ser  
180 185 190

Ser Ser Thr Ser Ser Gly Trp  
195

<210> 28

<211> 199

<212> PRT

5 <213> Torque teno virus

<400> 28

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe  
1 5 10 15

Cys Gly Cys Lys Asp Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp  
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly  
35 40 45

Gly Gly Asp Ala Ser Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala  
50 55 60

ES 2 767 781 T3

Ala Ala Gln Ser Gly Glu Ala Thr Glu Pro Lys Asp Ser Lys Gln Pro  
65 70 75 80

Ser Glu Ile Pro Ala Pro Tyr His Val Pro Leu Asn Pro Gly Asn Gly  
85 90 95

Thr Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Pro Pro Arg Tyr Lys Thr Gln Ser Ser  
100 105 110

Thr Leu Gly Thr Met Thr Val Thr Gly Leu Leu Glu Gln Ile Leu Ser  
115 120 125

Lys Asp Phe Ser Asn Ser Pro Gln Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
130 135 140

Thr His Ser Leu Asp Lys Lys Gln Arg Lys Ser His Tyr Gln Thr Pro  
145 150 155 160

Thr Lys Arg Ala Leu Ser Gln Ala Arg Ala Val Asp Pro Leu Lys Lys  
165 170 175

Lys Arg Arg Arg Glu Glu Asp Ser Thr Ser Gln Ala Ser Asp Asp Ser  
180 185 190

Ser Ser Thr Ser Ser Gly Trp  
195

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Torque teno virus

<400> 29

tccgaatggc tgagttatg c

21

<210> 30

<211> 17

10 <212> ADN

<213> Torque teno virus

<400> 30

tccgctcagc tgctcct

17

<210> 31

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Torque teno virus

<400> 31

ggtggtaaag aggatgaa

18

20 <210> 32

ES 2 767 781 T3

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 32	
5	aatagattgg acacaggag	19
	<210> 33	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
10	<400> 33	
	tatcgggcag gacagct	18
	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Torque teno virus	
	<400> 34	
	taggggcgcg ctctacgt	18
	<210> 35	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 35	
	cctacatgaa ggagaaagac t	21
	<210> 36	
25	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 36	
	ccagcgtctc cagggtc	17
30	<210> 37	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 37	
35	aagctaccaa gggctgg	17
	<210> 38	

ES 2 767 781 T3

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 38	
5	gcggtctggt agcggtagt	19
	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
10	<400> 39	
	cgaatggctg agttatgcc gc	22
	<210> 40	
	<211> 11	
	<212> ADN	
15	<213> Torque teno virus	
	<400> 40	
	agtcctcatt t	11
	<210> 41	
	<211> 11	
20	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 41	
	aaccaatcag a	11
	<210> 42	
25	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 42	
	ctgggcgggt gccggag	17
30	<210> 43	
	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 43	
35	cggagtcaag gggc	14
	<210> 44	

ES 2 767 781 T3

	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 44	
5	tatcgggcag g	11
	<210> 45	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
10	<400> 45	
	tacacttccg gggtcaggag gct	23
	<210> 46	
	<211> 22	
	<212> ADN	
15	<213> Torque teno virus	
	<400> 46	
	actcagccat tcggaacctc ac	22
	<210> 47	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 47	
	caatttgct cgcttcgctc gc	22
	<210> 48	
25	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 48	
	tacttatatt cgcttctgtg ggaac	25
30	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 49	
35	agttacacat aaccacaaa cc	22
	<210> 50	

# ES 2 767 781 T3

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
	<400> 50	
5	attaccgcct gccgatagg c	21
	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Torque teno virus	
10	<400> 51	
	ccaaaccaca ggaaactgtg c	21
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Torque teno virus	
	<400> 52	
	cttgactccg ctctcaggag	20

**REIVINDICACIONES**

1. Composición inmunogénica que comprende una proteína según SEQ ID NO. 16.
2. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, en la que la proteína es una proteína recombinante expresada en bacterias o baculovirus purificada.
- 5 3. Composición inmunogénica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición inmunogénica contiene además un adyuvante.
4. Método *in vitro* para diagnosticar la infección por PTTV, que comprende:
  - i) inmovilizar una proteína representada por SEQ ID NO. 16;
  - 10 ii) poner en contacto una muestra de suero de un cerdo que se sospecha que presenta infección por PTTV con la proteína inmovilizada; y
  - iii) detectar anticuerpos capturados específicos para la proteína.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la detección del anticuerpo capturado es a través de inmunotransferencia de tipo Western o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

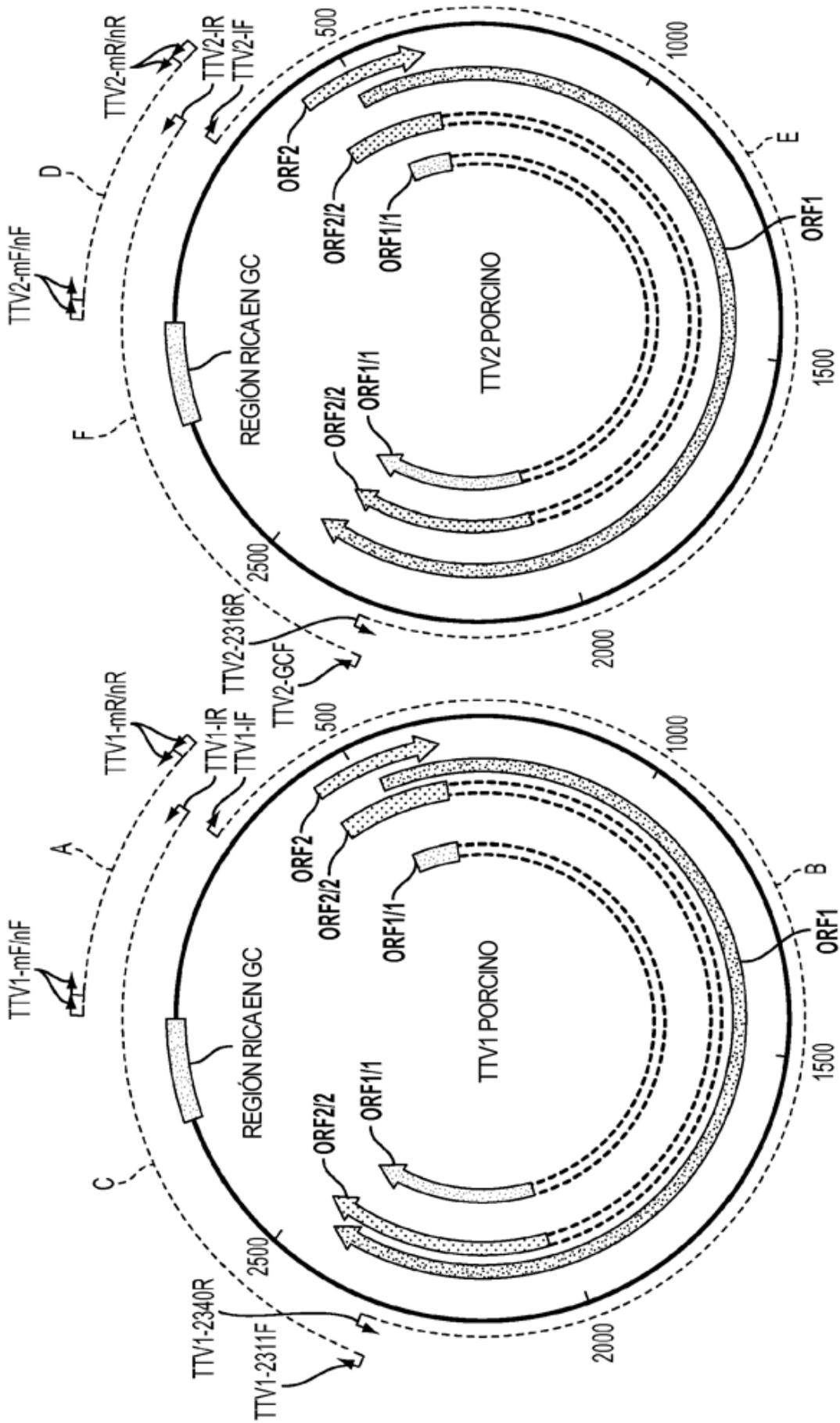


FIG. 1A

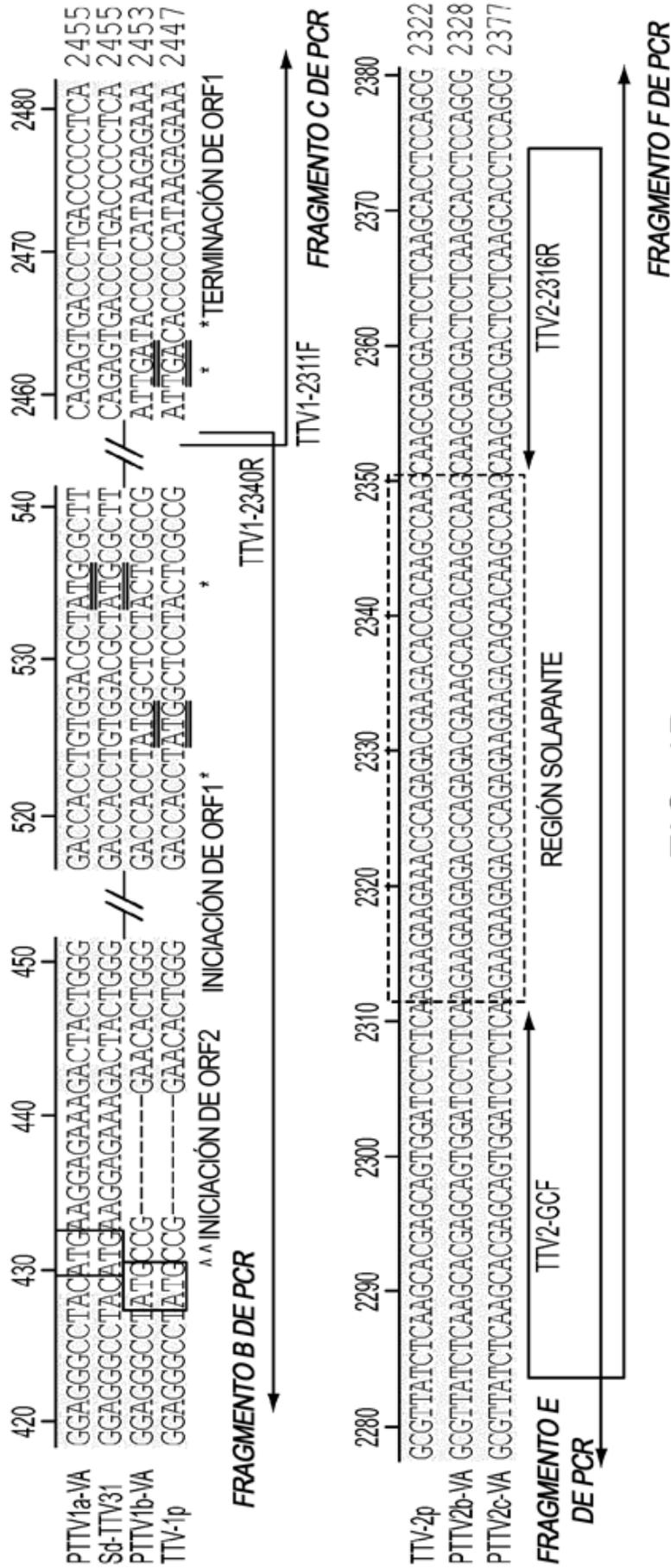


FIG. 1B

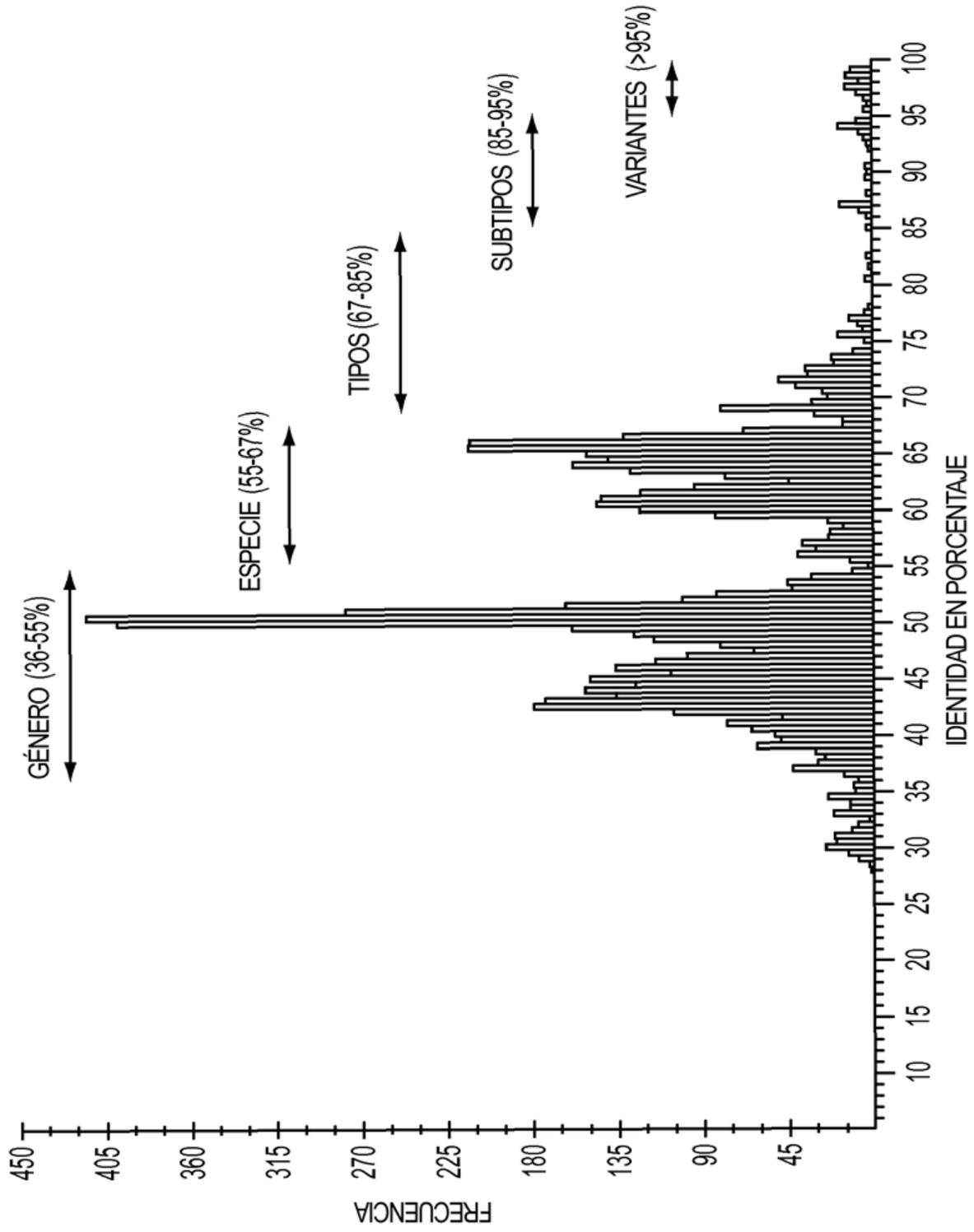


FIG. 2

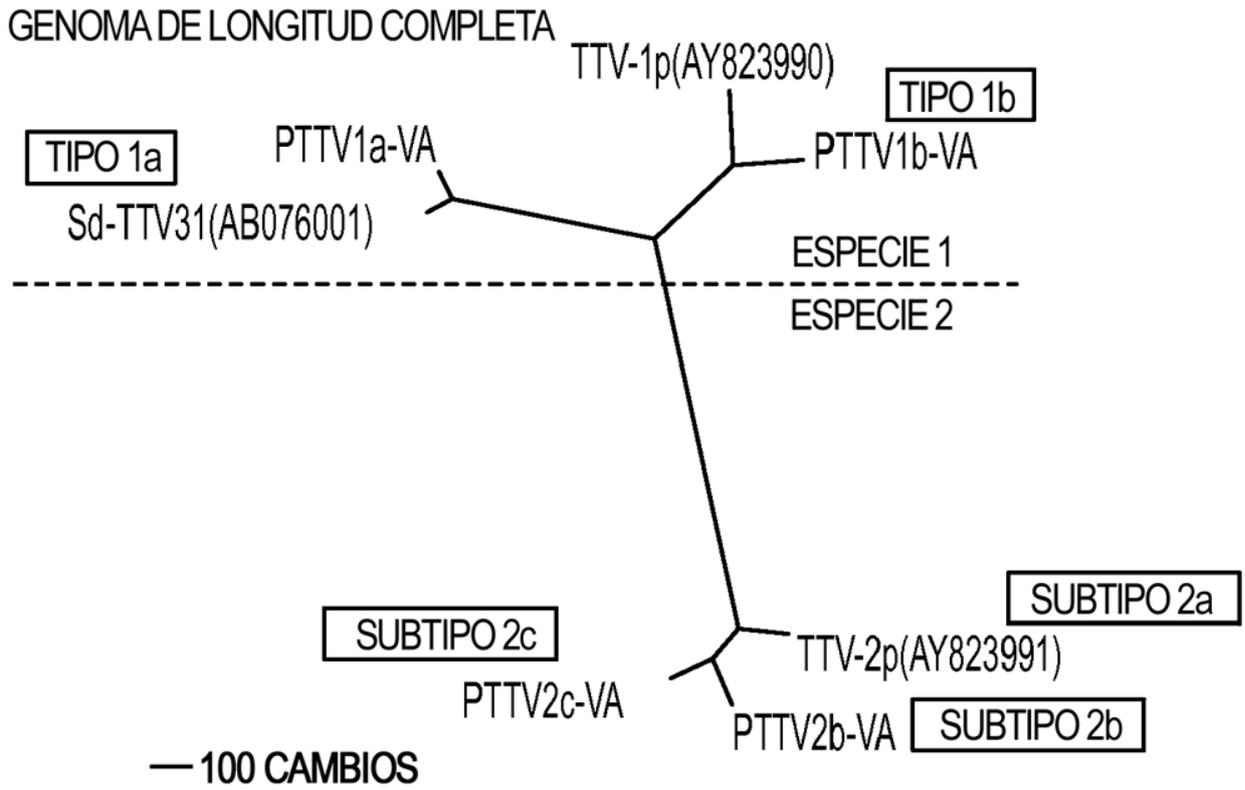


FIG. 3A

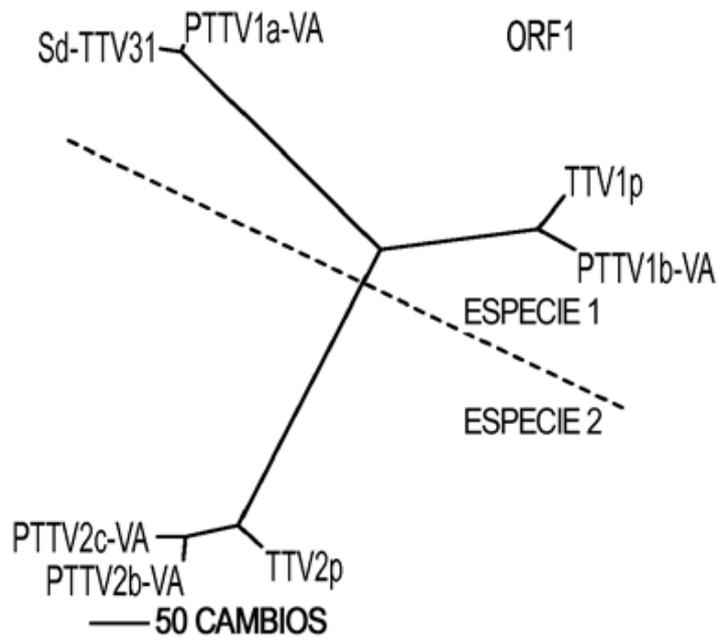


FIG. 3B

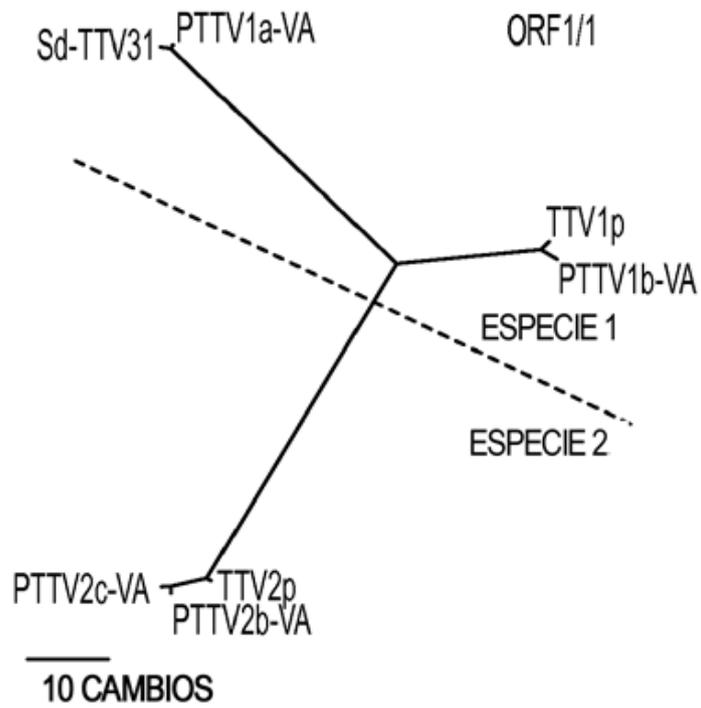


FIG. 3C

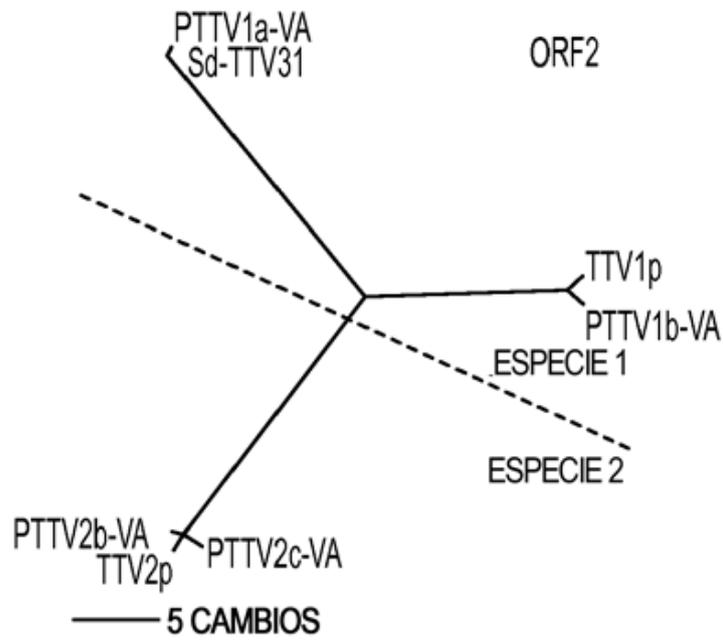


FIG. 3D

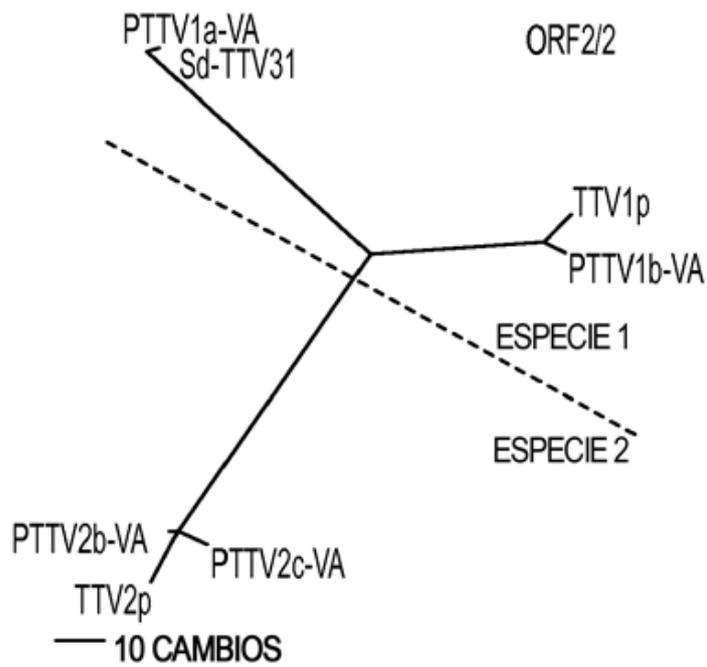


FIG. 3E

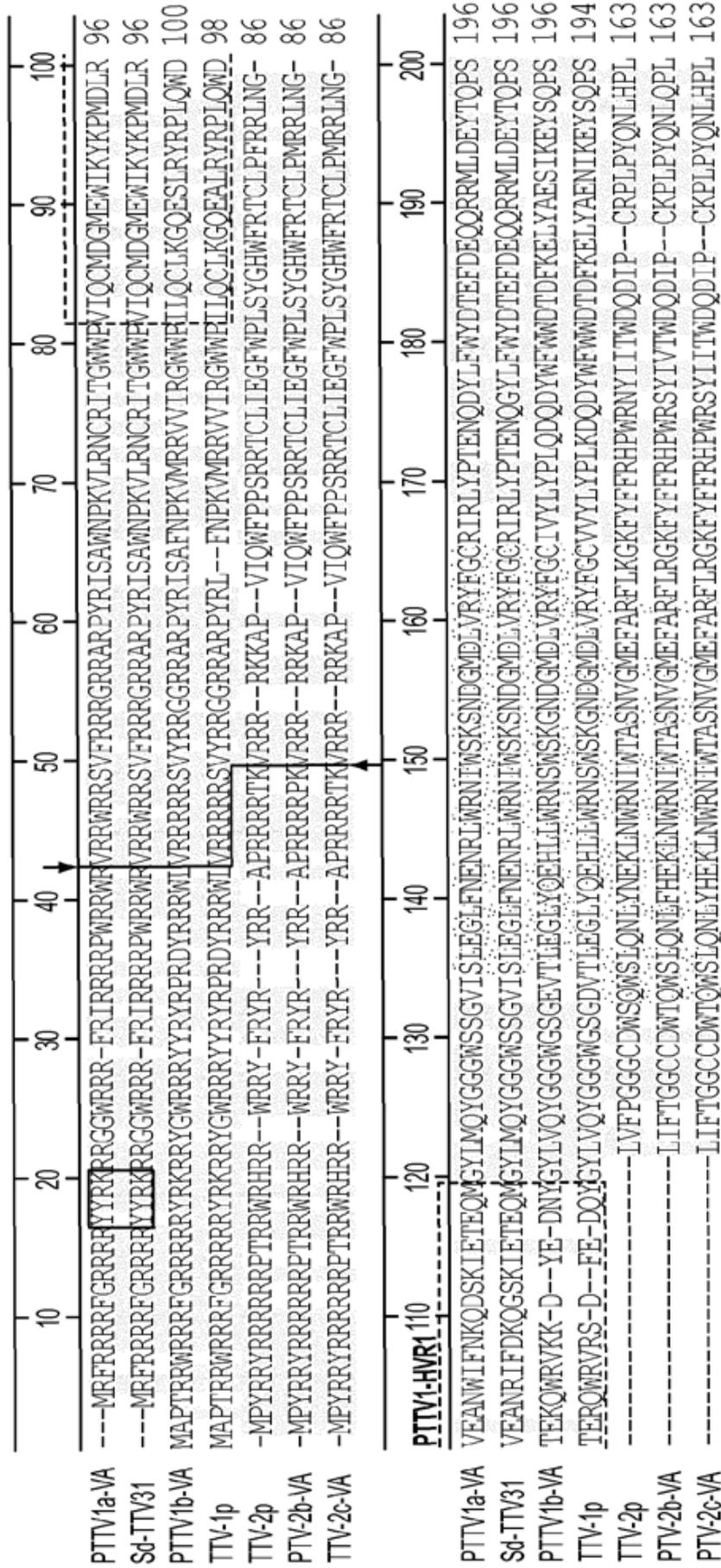


FIG. 4A

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
PTTV1a-VA	VMIQAKNSRLIVCKQKMPIRRRVK--SIFIPPPAQLTTQWKFOQELCQFFLFWNACICIDMDTPFDYNG--AMRNAAWLMRRLQNG-----NMEYIERW	286									286
S6-TTV31	VMIQAKNSRLIVCKQKMPIRRRVK--SIFIPPPAQLTTQWKFOQELCQFFLFWNACICIDMDTPFDYNG--AMRNAAWLMRRLQNG-----NMEYIERW	286									286
PTTV1b-VA	VMMWAKRTRLVIARDRAPHRRRVR--KIFIPPPSRDTTQWFQCTDFCKRPLFTWAAGLIDMOKPFDANG--AFRNAAWLETRNDQG-----EMKYIELW	286									286
TTV-1p	VMMWAKRTRIVIARERAPHRRKVR--KIFIPPPSRDTTQWFQCTDFCKRKLFTWAAGLIDMOKPFDANG--AFRNAAWLEQRNDQG-----EMKYIELW	284									284
TTV-2p	IMLLKKQHKLIVLSQNCNPNRQKPVTLKFKPPKLTSSQWRLSRELAKMPLIRLGVSFIDLTEPWEVGNFAYSVLGYEAVKDQGHWSNWIQIKYYWIY	263									263
PTV-2b-VA	IMLLKKQHKLIVLSQKDCNPNRQKPVTLKFRPPKLTSSQWRLSRELAKMPLIRLGVSLIDLSEPWLEGNFAYSVLGYEASKHSGRWSNWIQKYYFWIY	263									263
PTV-2c-VA	IMLLKKQHKLIVLSQKDCNPNRRQKPVTLKIRPPKLTSSQWRLSRELAKMPLIRLGVSLIDLSEPWLEGNFAYSVLGYEASKHSGRWSNWIQKYYFWIY	263									263
	310	320	330	340	PTTV1-HVR2	360	370	380	390	400	
PTTV1a-VA	GRIPMTGDTELPADDFKAGGVNKNFKPTG--IQRIYPIFAVCLVEGNKRVVKKWATVHNGPIIDRWKKTGTTLKLSNLRG-----LVLRVCSESEYTYK	378									378
S6-TTV31	GRIPMTGDTELPADDFKAGGVNKNFKPTG--IQRIYPIFAVCLVEGNKRVVKKWATVHNGPIIDRWKKTGTTLKLSALRR-----LVLRVCSESEYTYK	378									378
PTTV1b-VA	GRVPPQGDTELPKQSEFKKGGDNNPNVNI <del>TEGHEKNIYPIIIYVDQKDKTRKKYCVCYNKTIARWRKAQASTLAIGDLQG-----LVLRQLMNQEMIIY</del>	380									380
TTV-1p	GRVPPQGDSELPKKKEFSTGTDNPNVNVQDNEEKNIYPIIIYVDQKDKPRKKYCVYNKTIARWRLQASTLKI <del>GNLKG-----LVLRQLMNQEMIIY</del>	378									378
TTV-2p	DTGVGNNAVIVILLKKDVTDPGNMATTFKAS--GGQHPDAIDHIELINQGWPLYFYKSEQDIKKEAHSAEISREYTRDPKSKKLIKIGIVGWASSNYT	361									361
PTTV2b-VA	DTGVGNNAVIVILLKKDVSNDPDMATQFVTG--SQQHPDAIDHIE <del>MNEGWPLYWFFYQSEQDIKKEAHDQDIVREYARDPKSKKLIKIGIVGWASSNYT</del>	361									361
PTTV2c-VA	DTGVGNNAVIVILLKQEVDDNPGAMATKFTVG--PGQHPDAIDRIEQINEGWPLYWFFYQSEQDIKKEAHDQEIAREYANNPKSKKLIKIGIVGWASSNFT	361									361

FIG. 4B

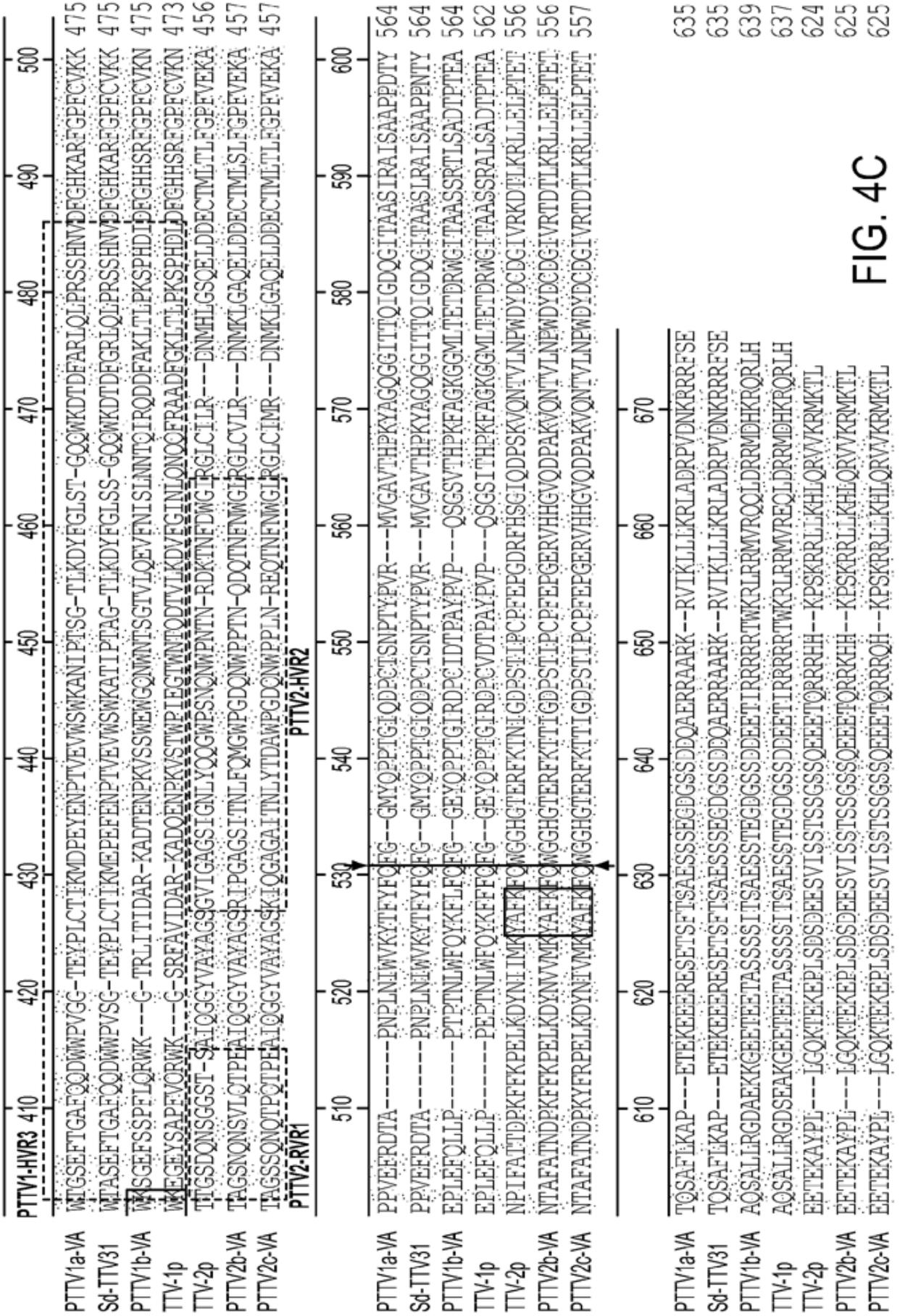


FIG. 4C

PTTV1a-VA	MKEKDYWEAAWLTSC	10	20	30	40	50	60	70	73
S6-TTV31	MKEKDYWEAAWLTSC	10	20	30	40	50	60	70	73
PTTV1b-VA	MP--EHWEEAWLEAT	10	20	30	40	50	60	70	72
TTV-1p	MP--EHWEEAWLEAT	10	20	30	40	50	60	70	72
TTV-2p	M-----EERWLT	10	20	30	40	50	60	70	68
PTTV1b-VA	M-----EERWLT	10	20	30	40	50	60	70	68
PTTV1c-VA	M-----EERWLT	10	20	30	40	50	60	70	68

FIG. 5

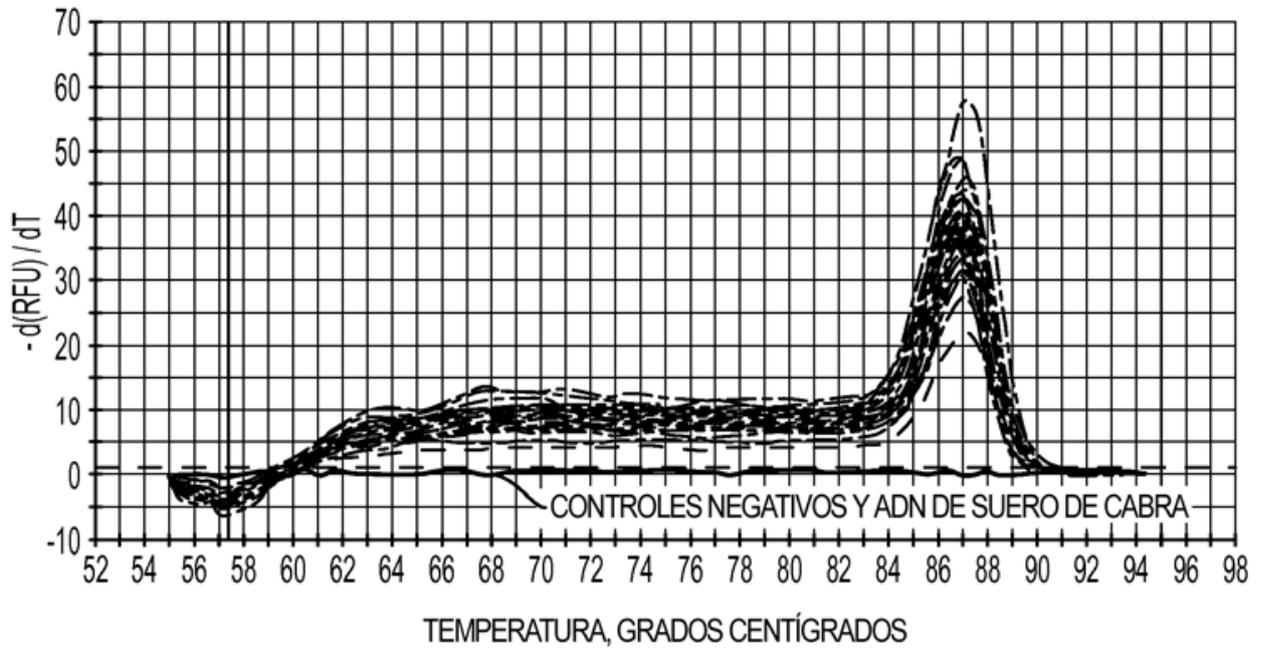


FIG. 6A

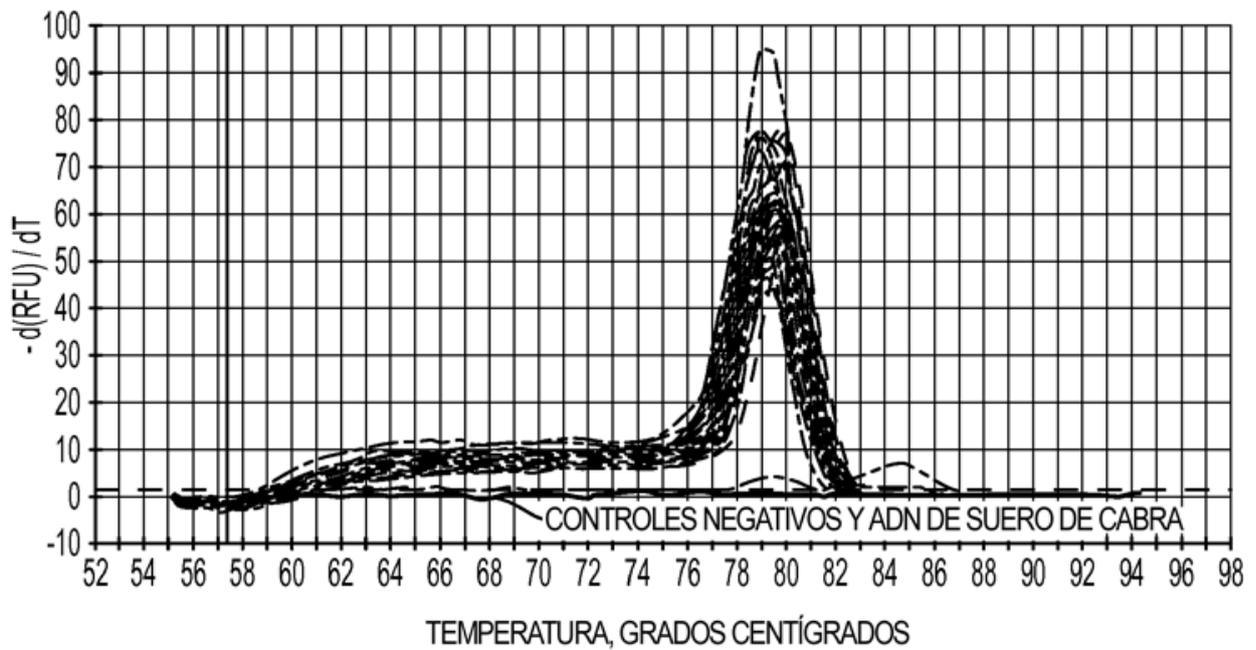


FIG. 6B

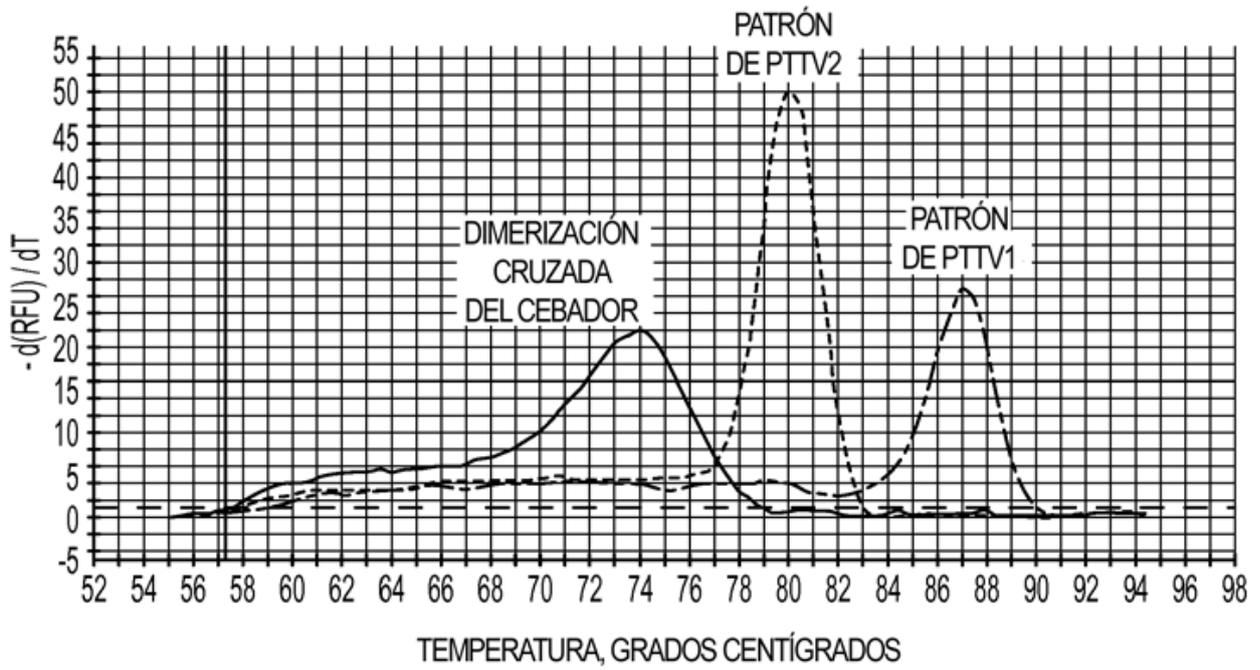


FIG. 7A

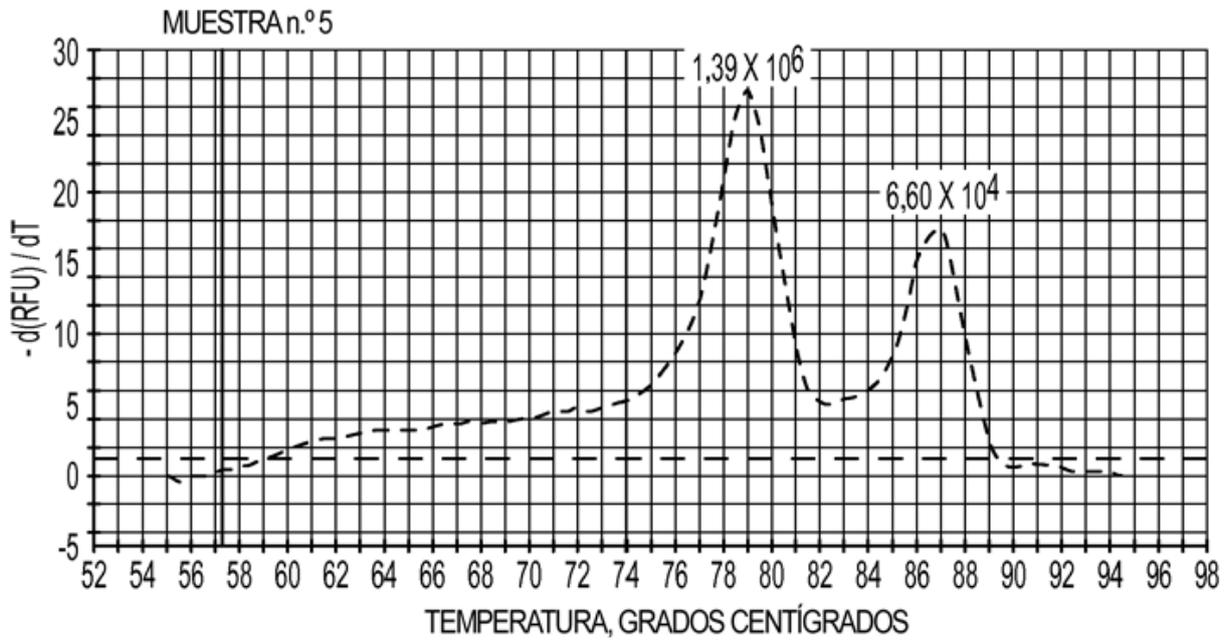


FIG. 7B

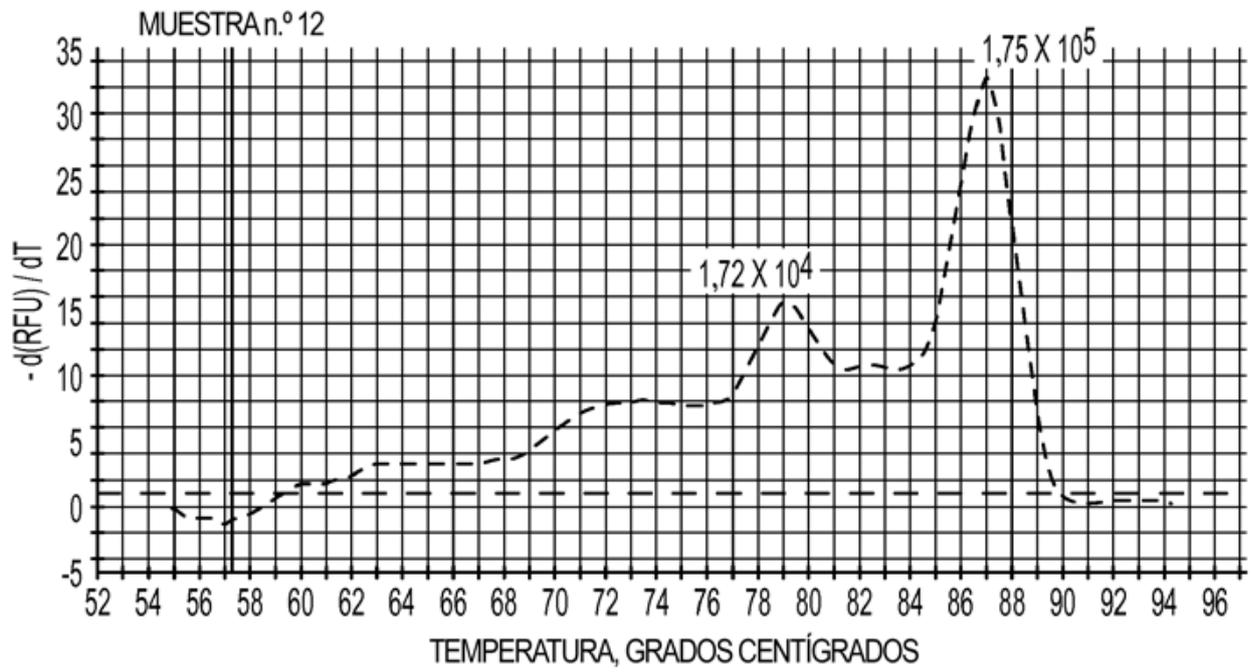


FIG. 7C

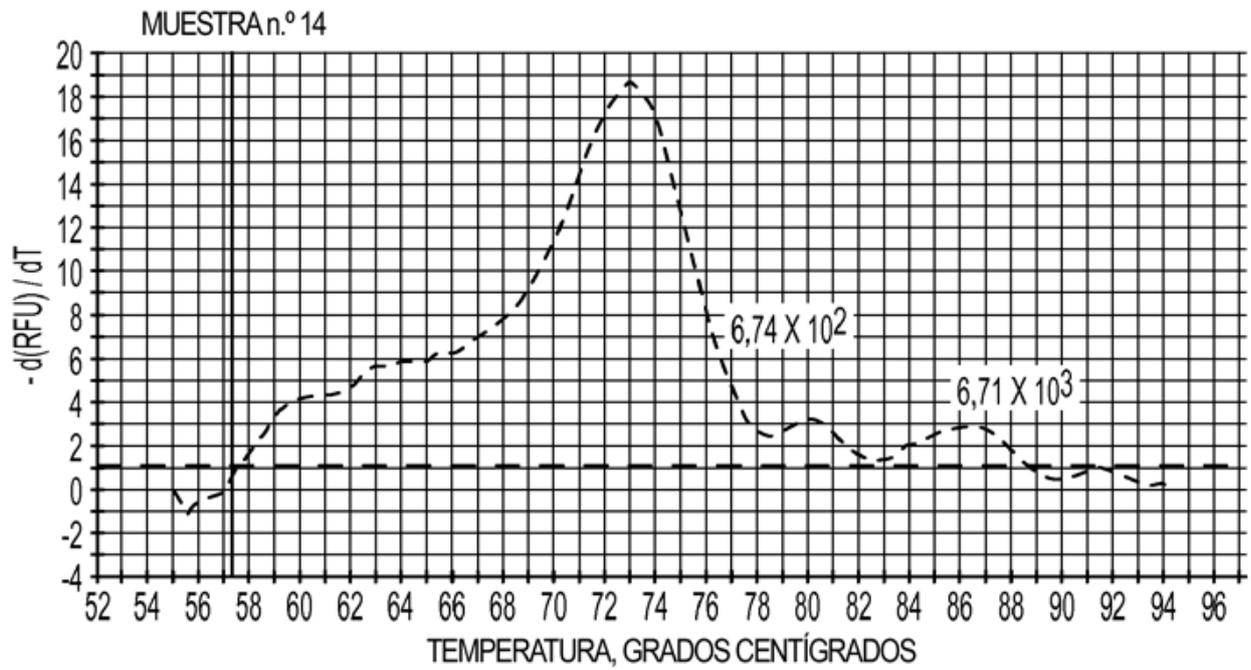


FIG. 7D

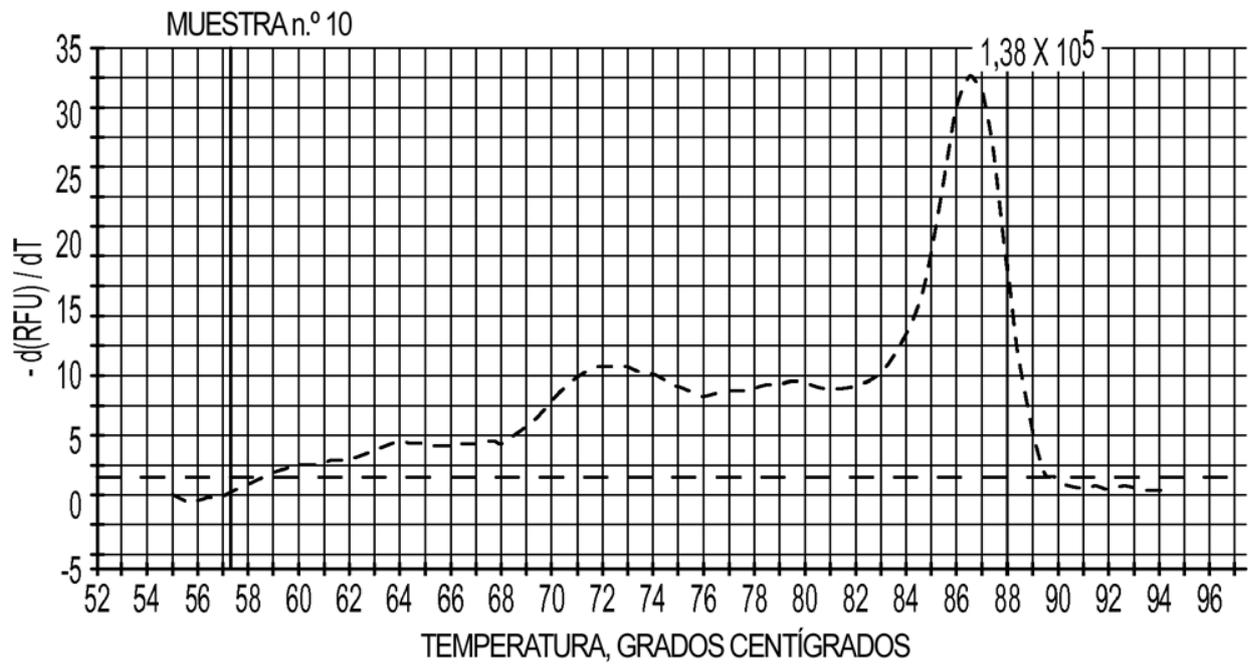


FIG. 7E



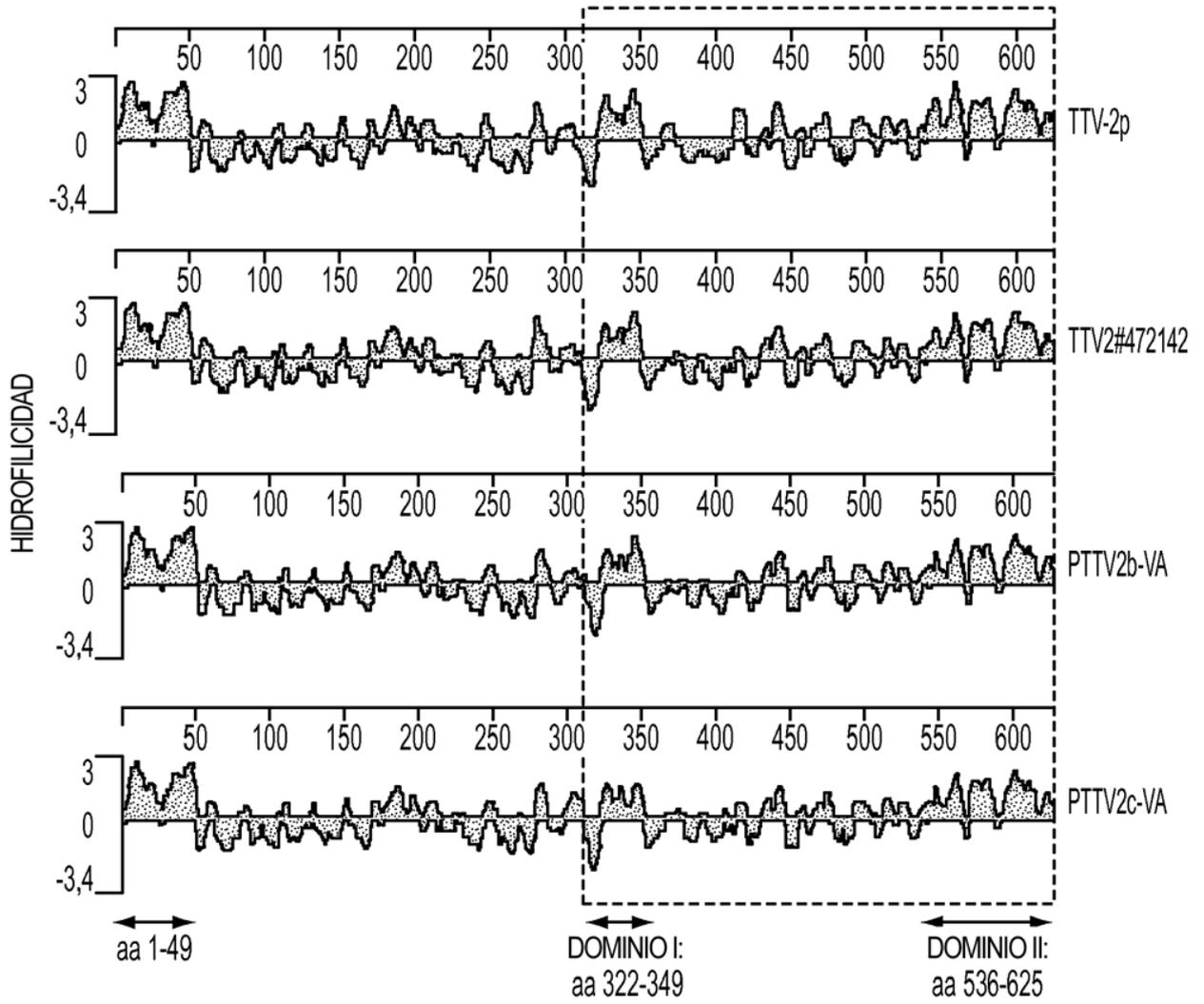


FIG. 9A

DOMINIO I 322 349  
 SECUENCIA SEQDIKKLAHDQXIAREYARDPKSKKIK  
 CONSENSO .....E.....NN  
 PTTV2c-VA .....D.V.....  
 PTTV2b-VA .....D.....  
 TTV2#472142 .....E..SAE..S..T.....  
 TTV-2p

DOMINIO II 536 625  
 SECUENCIA YDCDGIVRTDLKRLLELPTEETEETEKAYPLLGQKTEKEPLSDSDEESVISSSSGSSQEEETQRRRXHKPSKRRLKHLQRVVKRMKTL  
 CONSENSO .....Q.....KH.....Q.....H.....  
 PTTV2c-VA .....K.....E.....  
 PTTV2b-VA .....K.....E.....  
 TTV2#472142 .....K.....E.....  
 TTV-2p

FIG. 9B

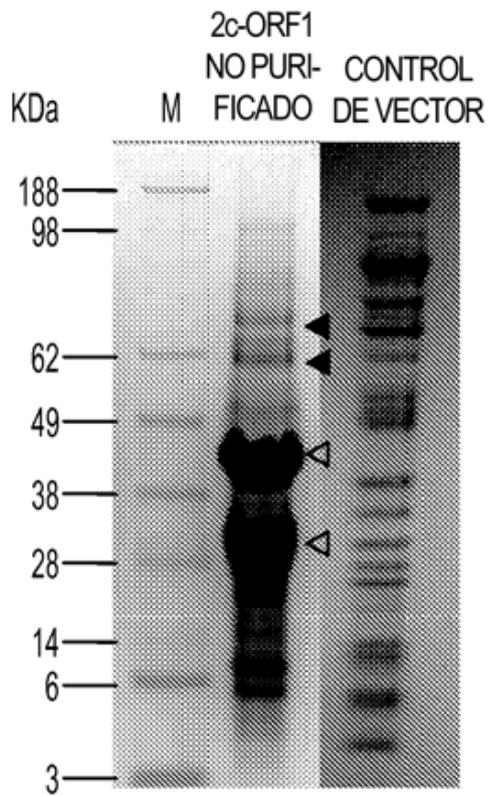


FIG. 10A

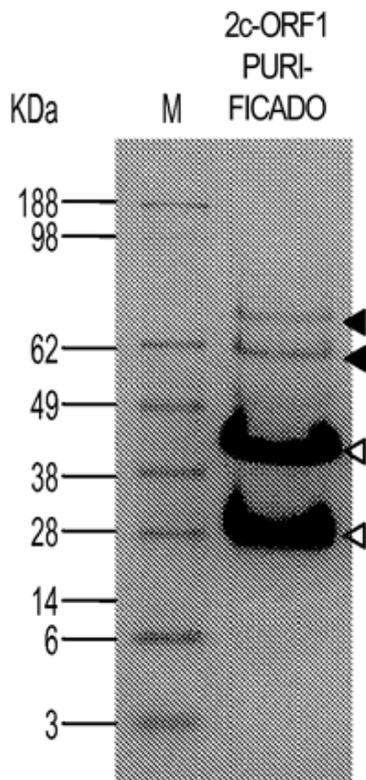


FIG. 10B

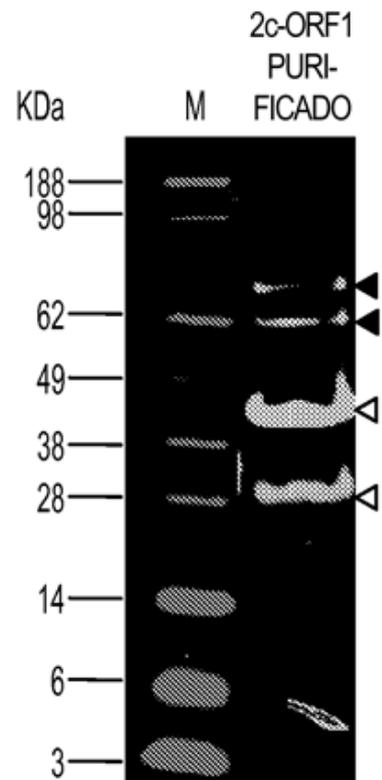


FIG. 10C

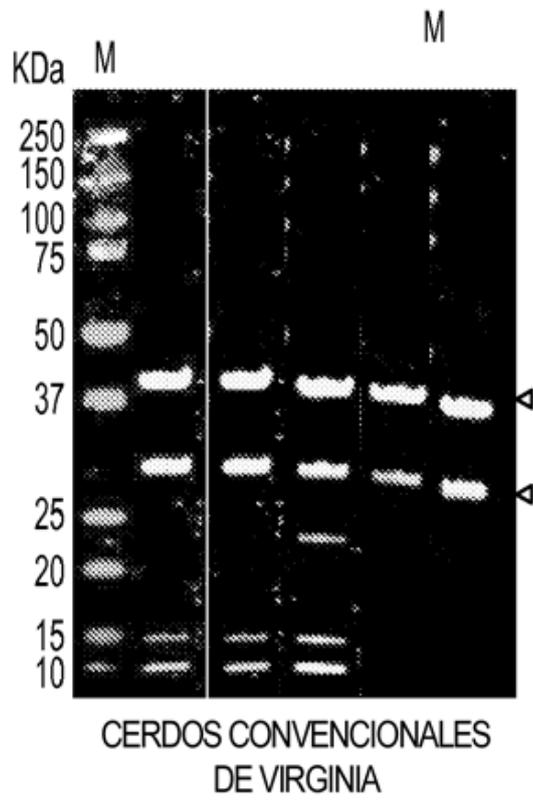


FIG. 11A

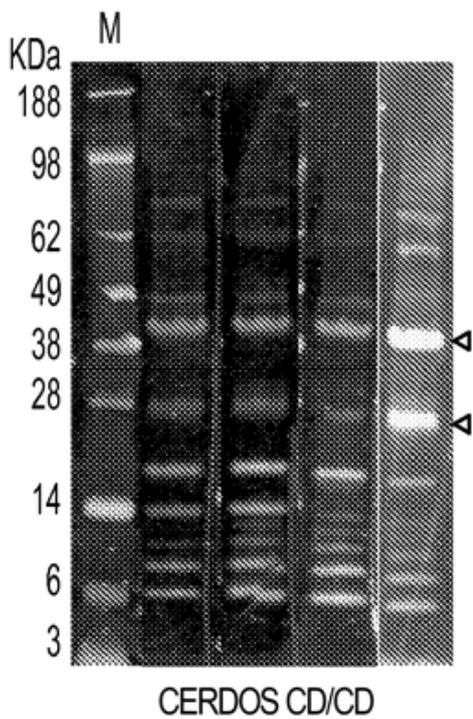


FIG. 11B

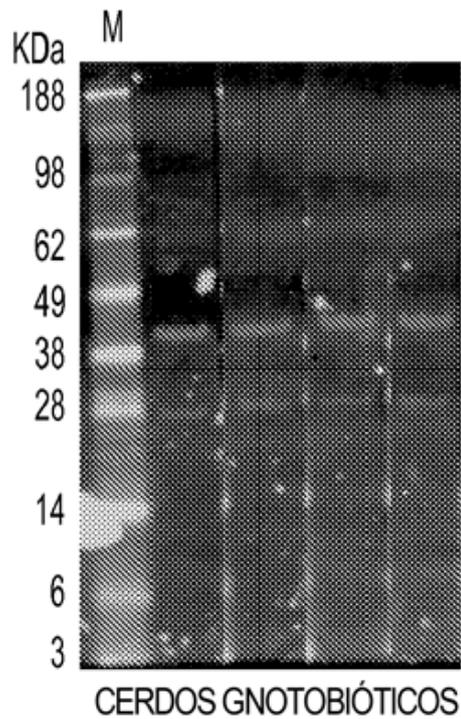


FIG. 11C

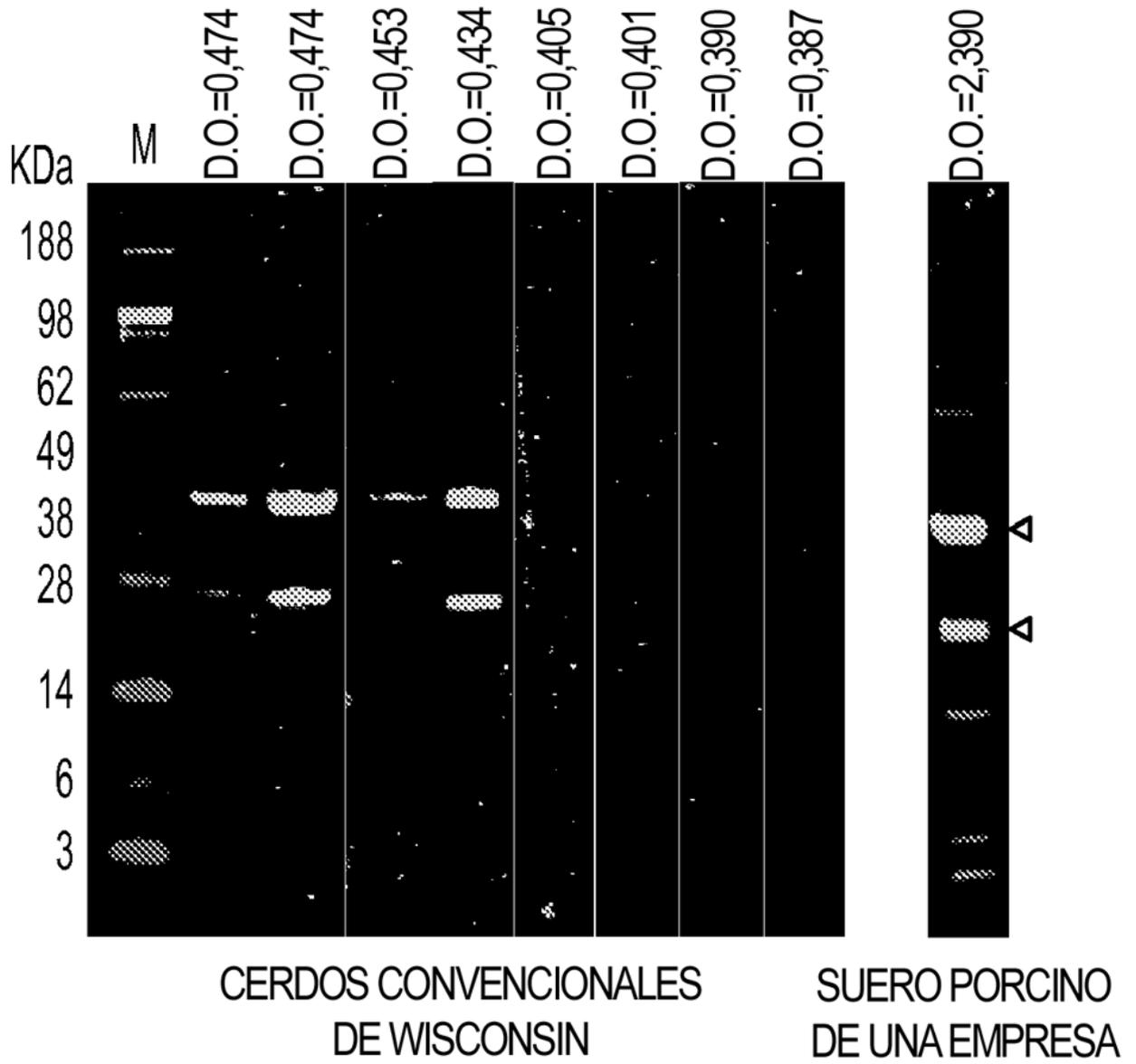


FIG. 12

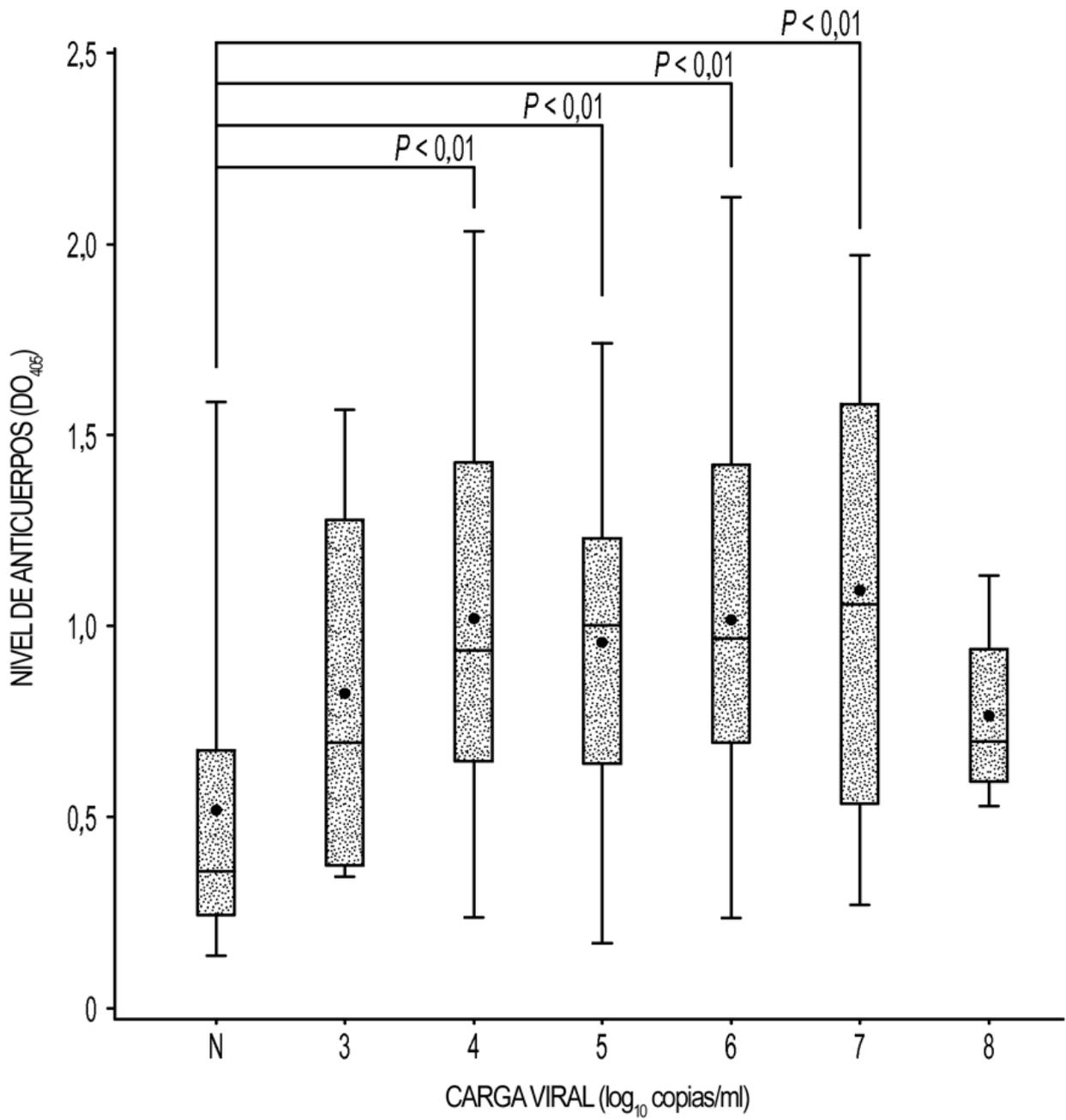


FIG. 13

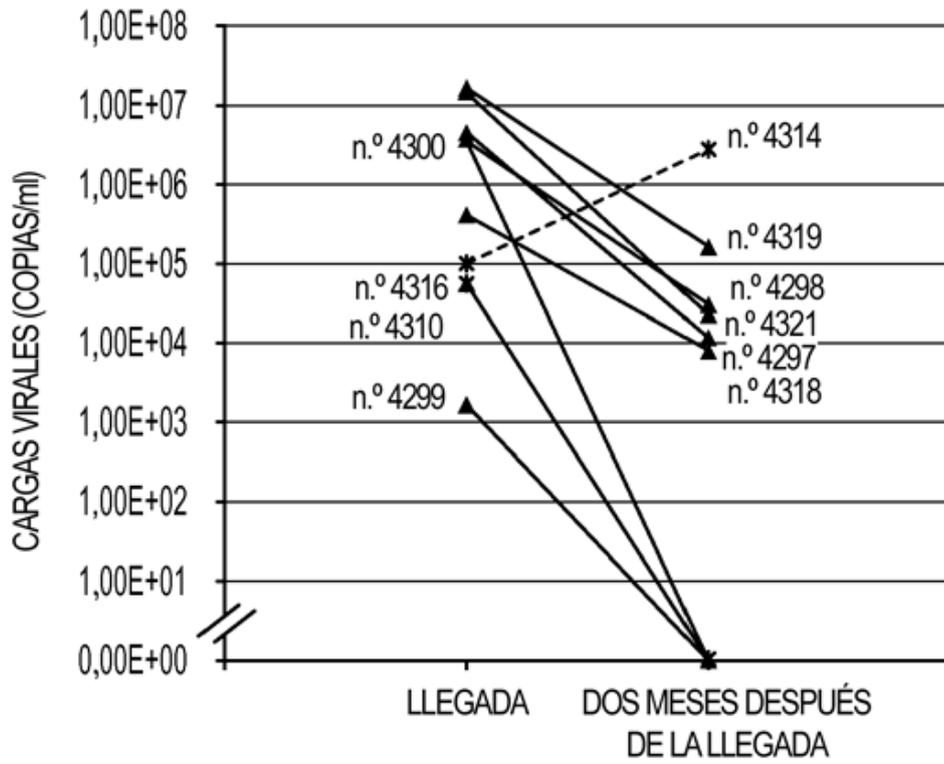


FIG. 14A

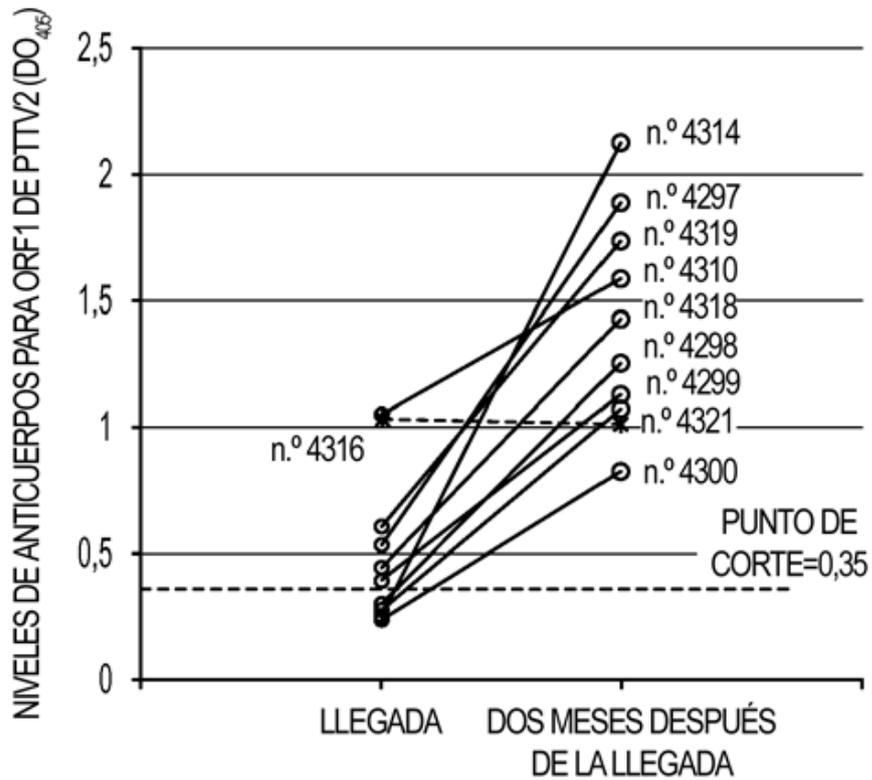


FIG. 14B

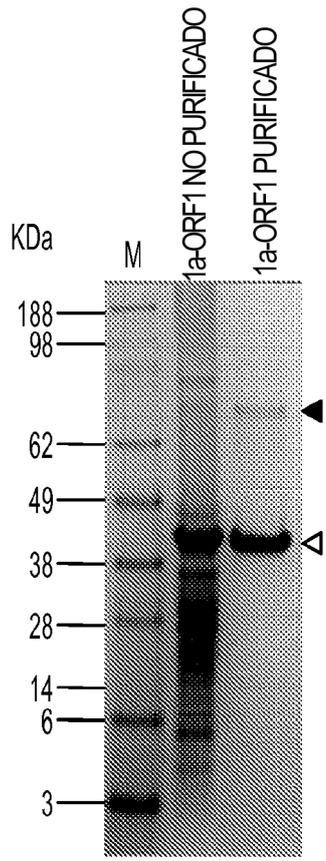


FIG. 15A

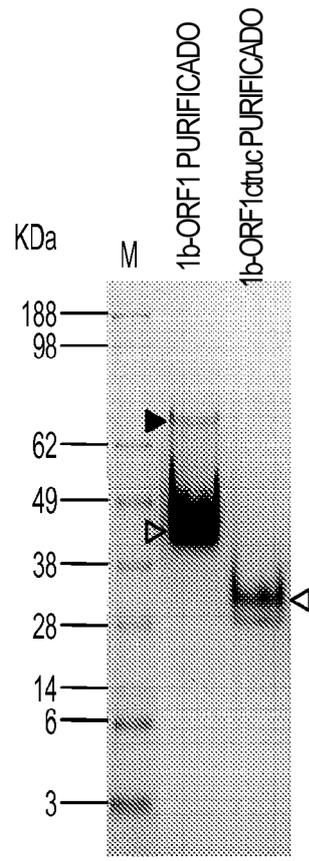


FIG. 15B

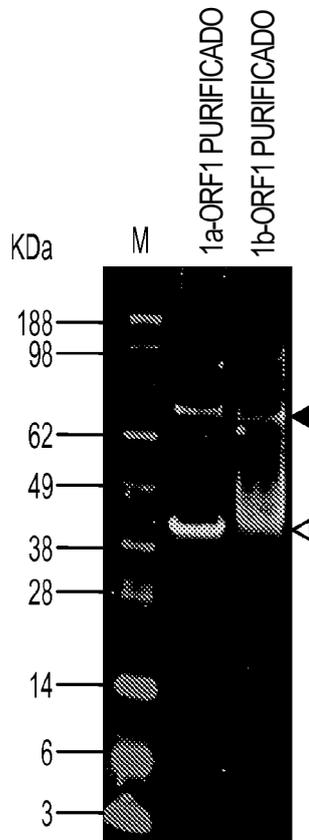


FIG. 15C

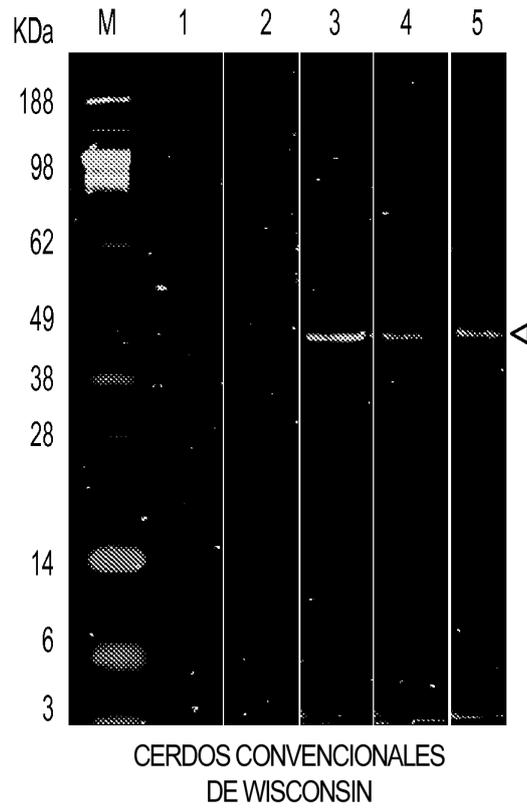


FIG. 16

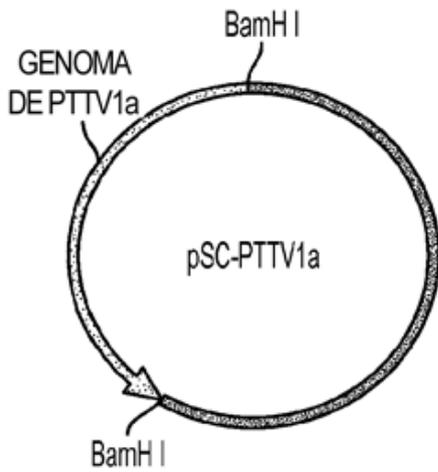


FIG. 17A

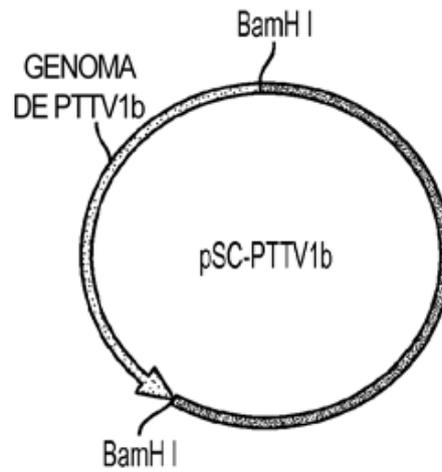


FIG. 17B

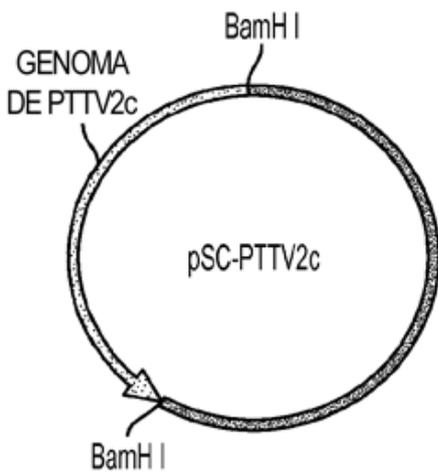


FIG. 17C

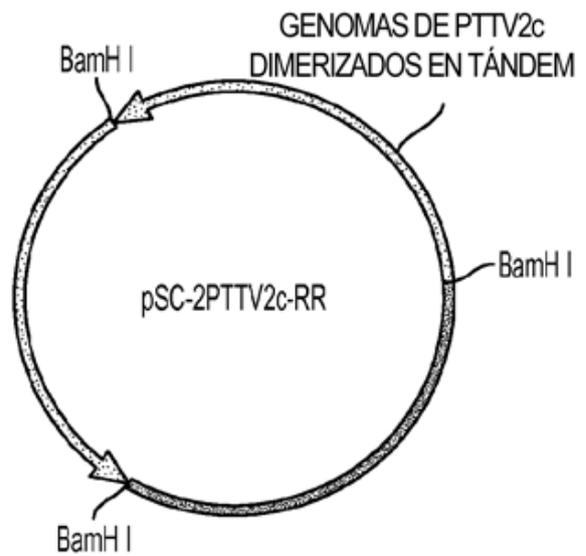


FIG. 17D

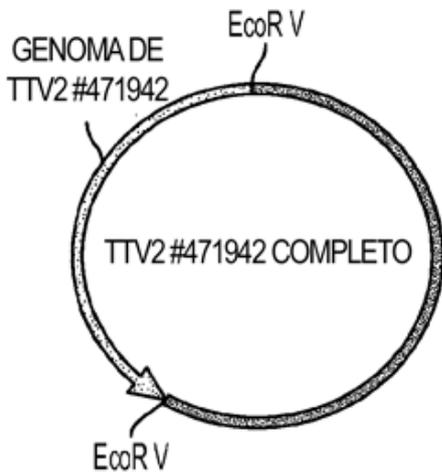


FIG. 17E

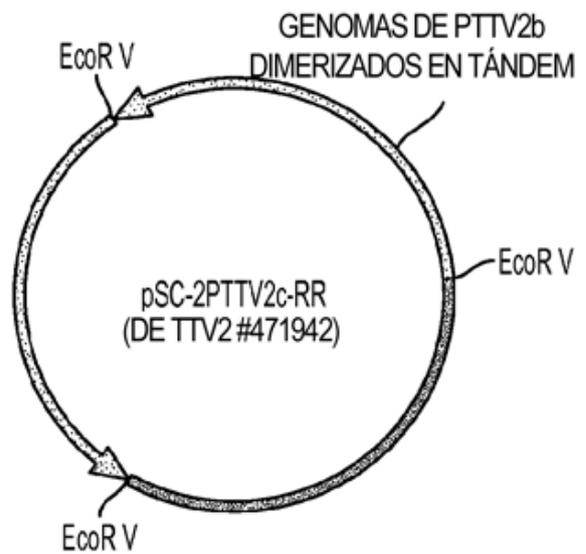


FIG. 17F

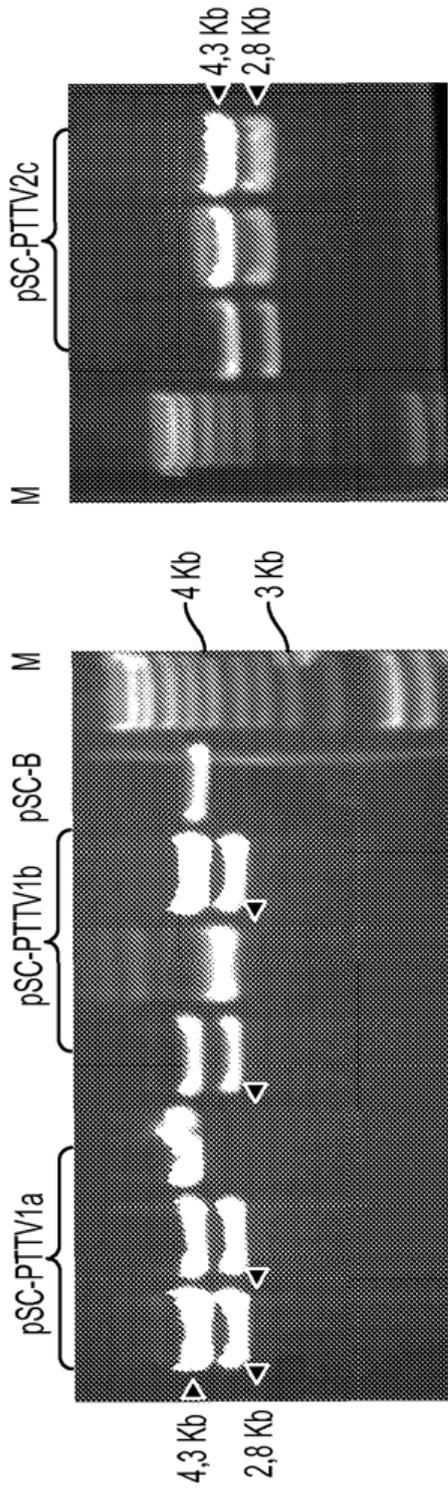


FIG. 18A

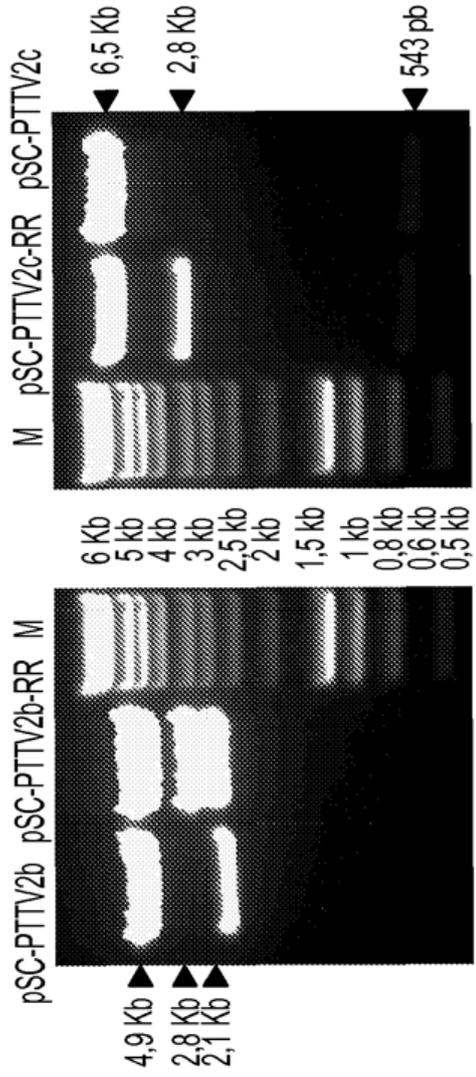


FIG. 18B

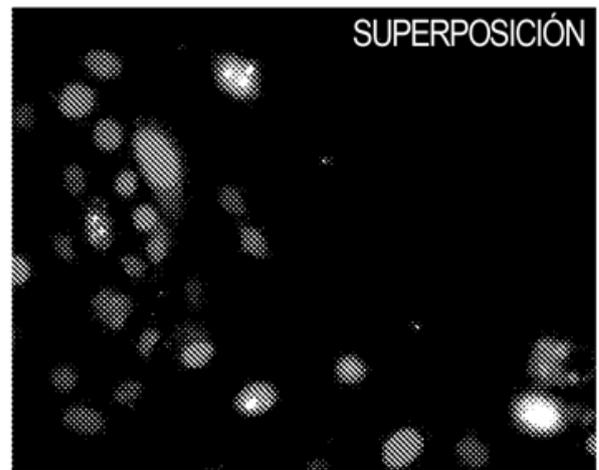
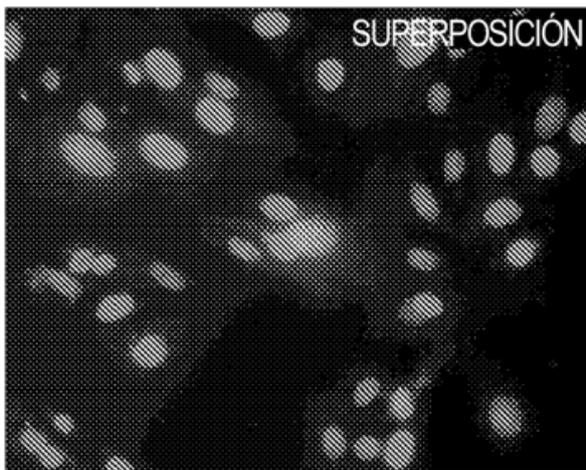
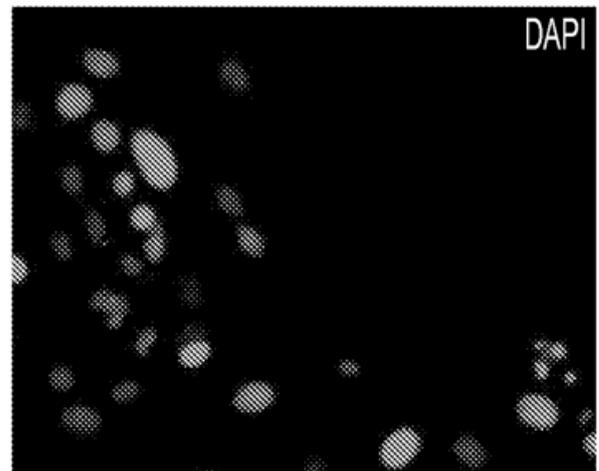
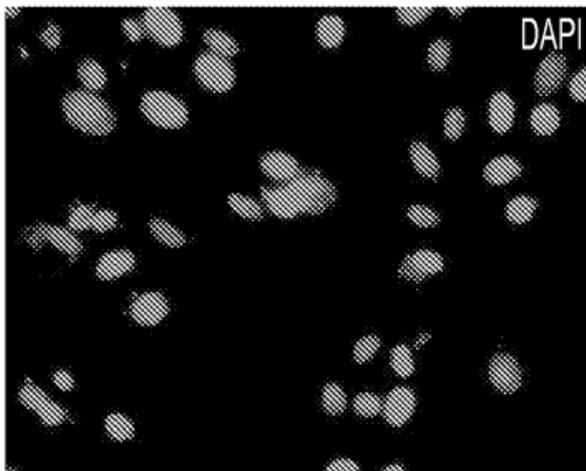
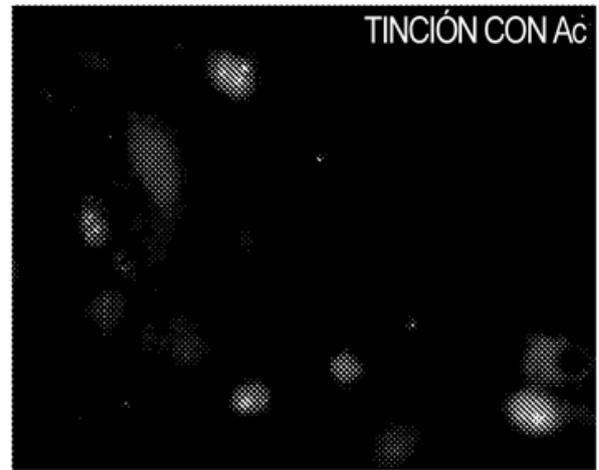
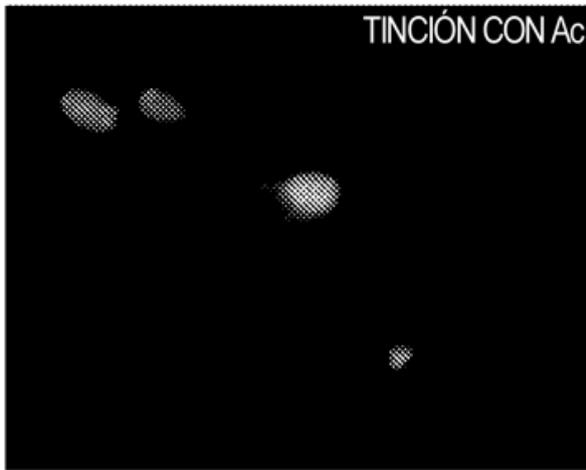


FIG. 19A

FIG. 19B

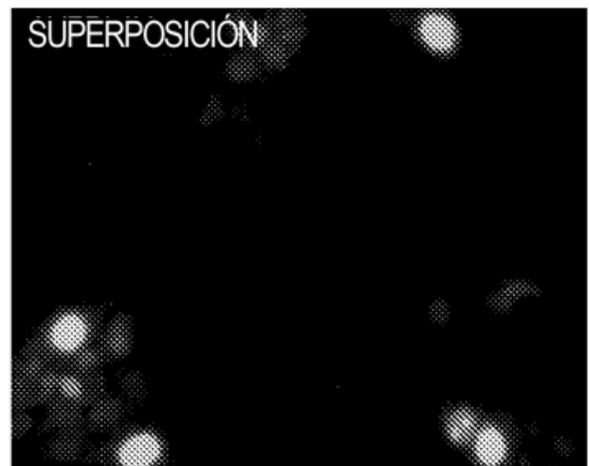
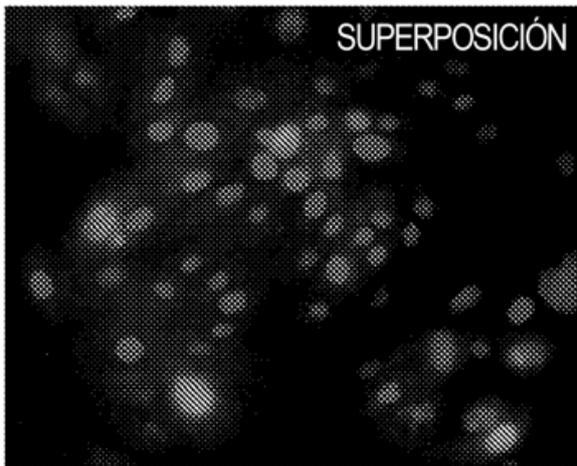
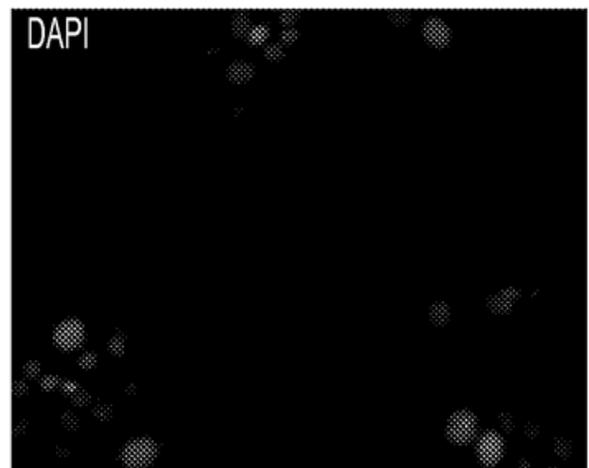
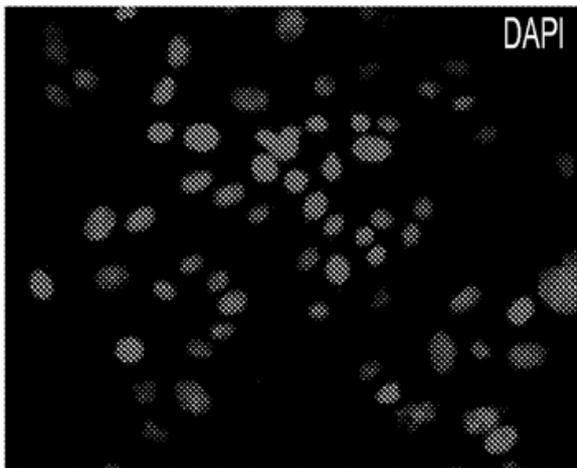
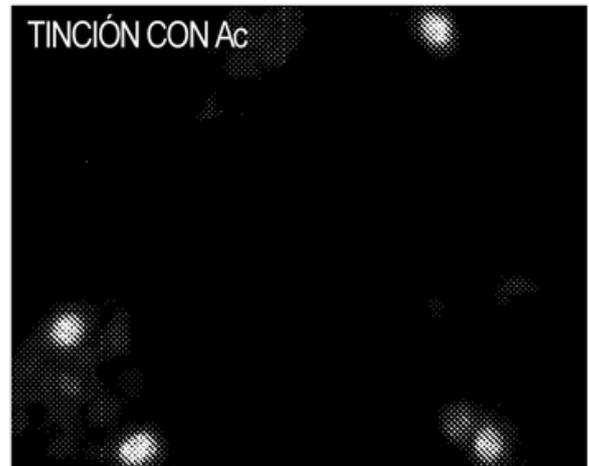
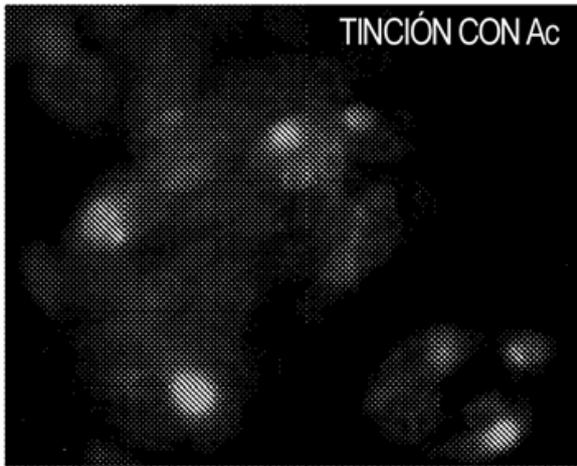


FIG. 20A

FIG. 20B

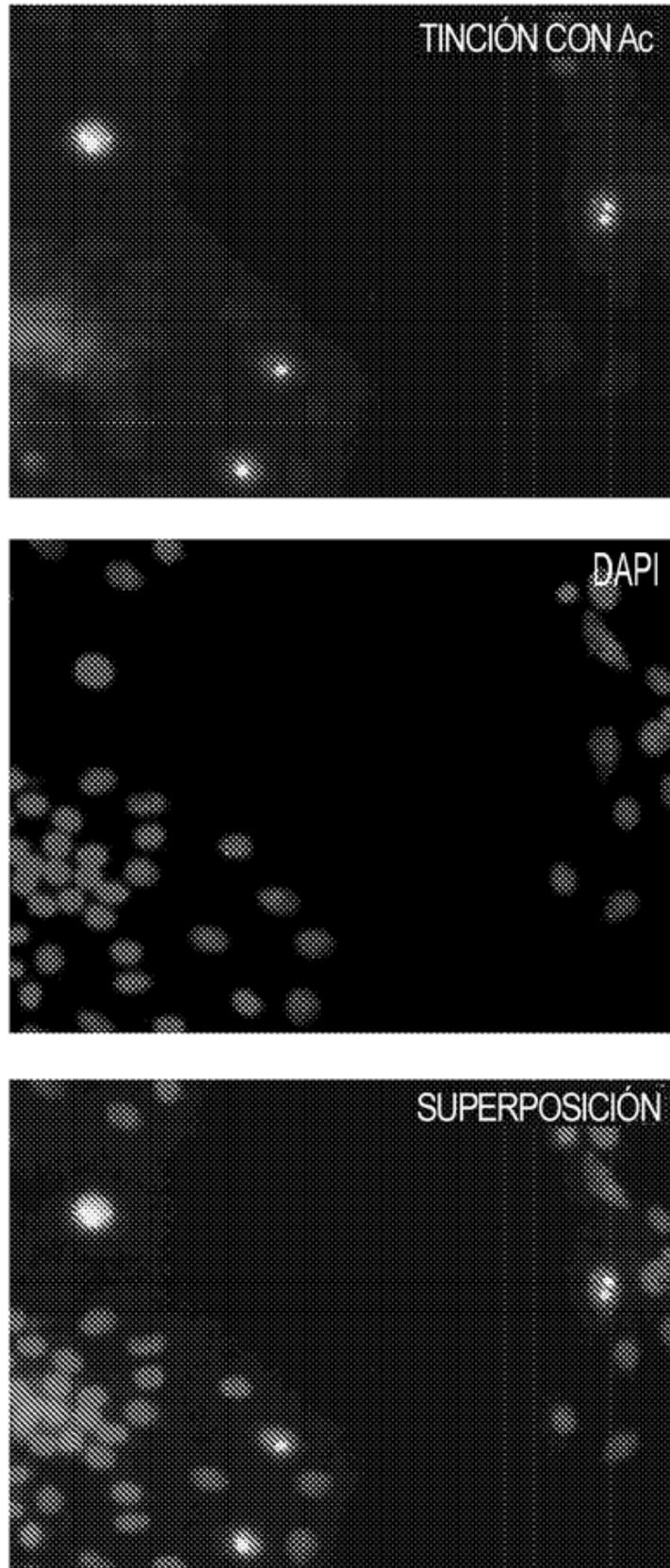


FIG. 21

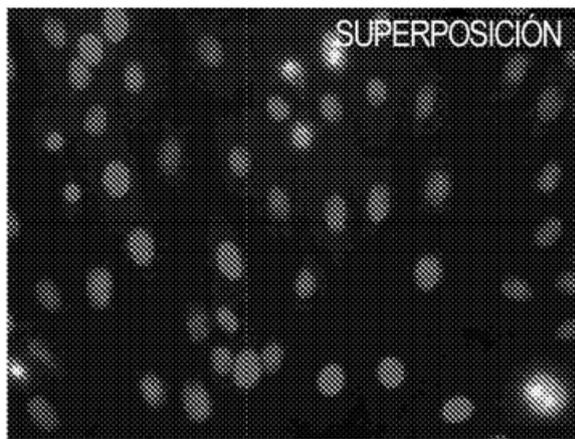
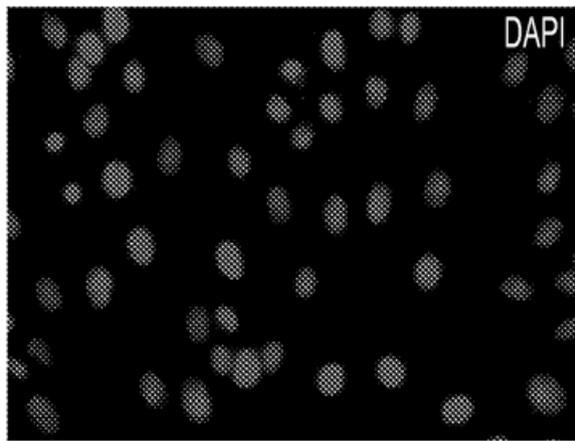
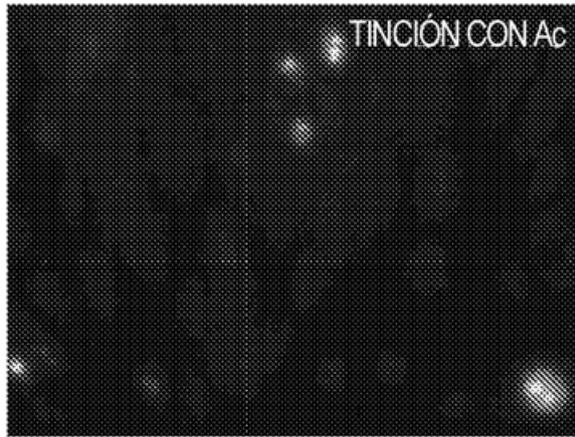


FIG. 22A

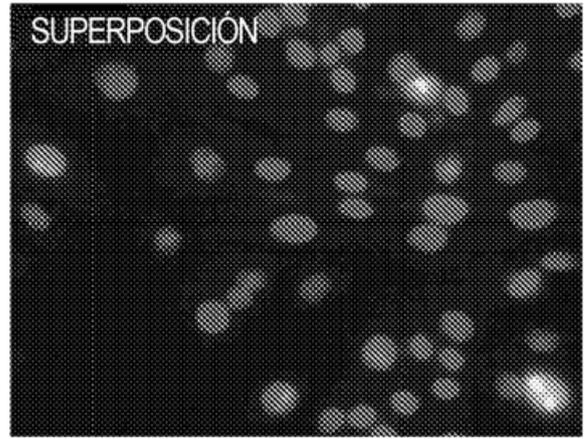
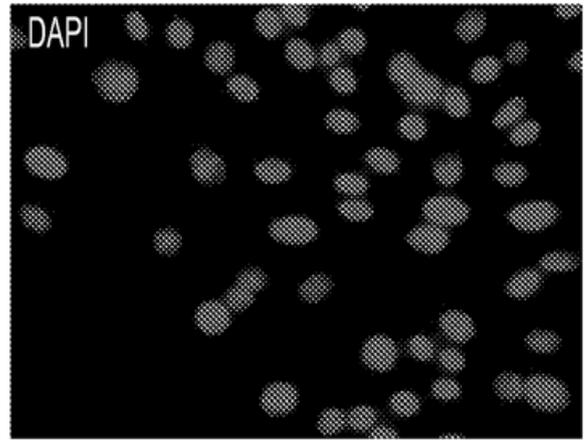
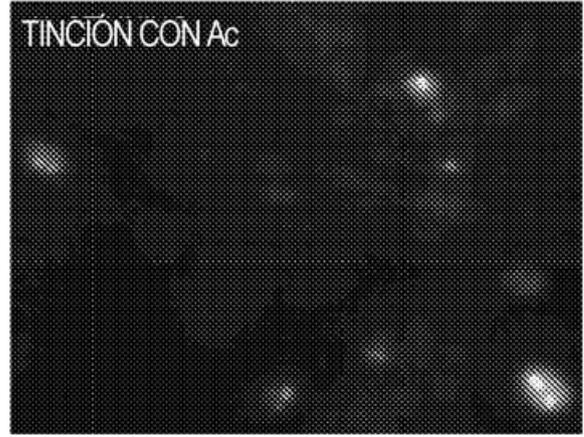


FIG. 22B

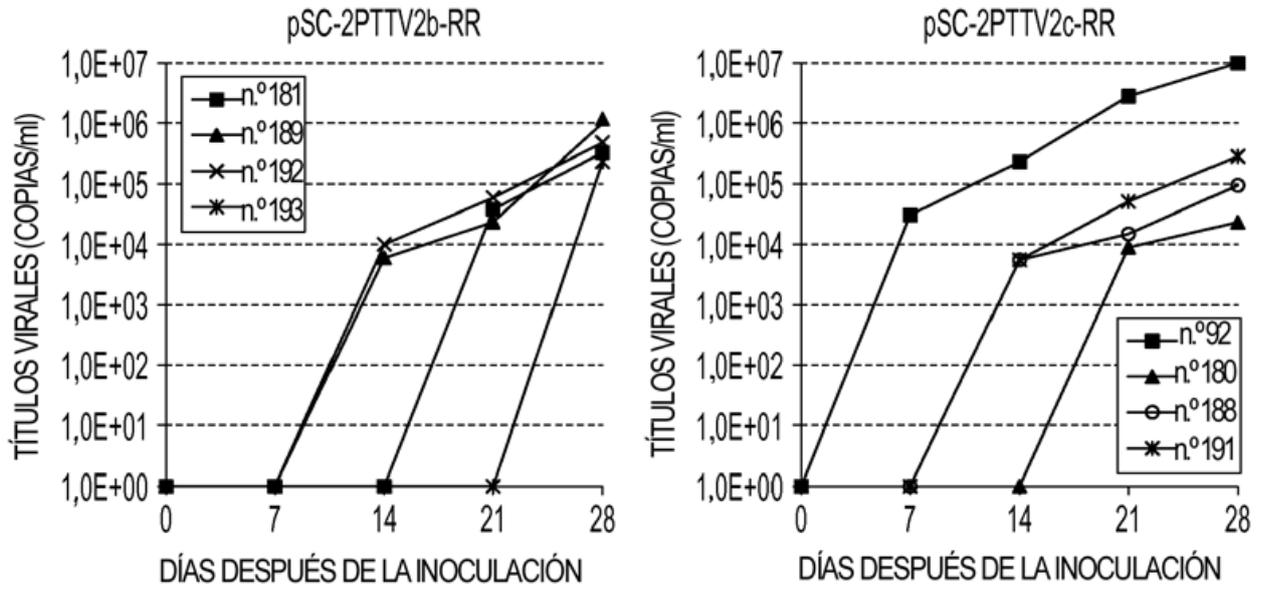


FIG. 23A

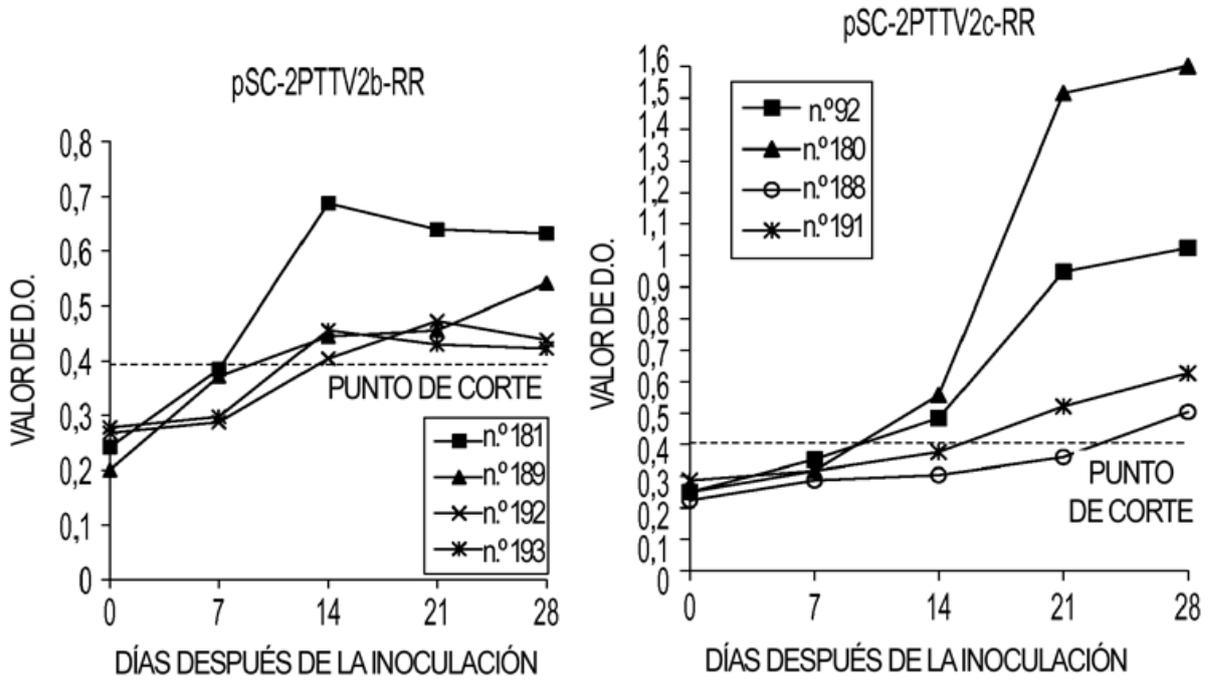


FIG. 23B